

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
und Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Klee

**Klinische und pathomorphologische Veränderungen in den
verschiedenen Stadien der bovinen Besnoitiose nach
natürlicher Infektion mit *Besnoitia besnoiti***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Martin Christoph Langenmayer
aus Friedrichshafen

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Koreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Klee
	Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer
	Univ.-Prof. Dr. Ralf Müller
	Univ.-Prof. Dr. Kurt Pfister

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Für M.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1	Allgemeines	3
1.1	Definitionen und Synonyme.....	3
1.2	Geschichte	4
1.3	Bedeutung	5
2	Der Parasit	5
2.1	Klassifikation.....	5
2.2	Genus <i>Besnoitia</i>	6
2.3	Morphologie	6
2.3.1	Organellen apikomplexer Parasiten	6
2.3.1.1	Rhoptrien.....	6
2.3.1.2	Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat.....	7
2.3.1.3	Dichte Granula.....	7
2.3.1.4	Konoid.....	8
2.3.1.5	Mikronemen	8
2.3.1.6	Apicoplast	8
2.3.2	<i>B. besnoiti</i> -Tachyzoiten	8
2.3.3	<i>B. besnoiti</i> -Bradyzoiten	10
2.3.4	Gewebezysten von <i>B. besnoiti</i>	10
2.4	Motilität.....	12
2.5	Wirtszell-Invasion	13
2.6	Intrazelluläre Multiplikation.....	14
2.7	Lebenszyklus und Wirte	15
2.8	Zoonotisches Potential.....	17
3	Epidemiologie	17
3.1	Seroprävalenz.....	17

3.2	Übertragung	19
4	Risikofaktoren	20
4.1	Einfluss des Alters.....	20
4.2	Einfluss des Geschlechts.....	20
4.3	Einfluss der Jahreszeit	21
4.4	Einfluss der Rasse	21
4.5	Einfluss von Vektoren und Reservoirwirten.....	22
5	Immunologie.....	22
5.1	Allgemeines	22
5.2	Angeborenes Immunsystem	23
5.3	Erworbene Immunantwort: zelluläre Antwort	23
5.4	Erworbene Immunantwort: humorale Antwort	24
6	Pathogenese	24
7	Pathologie.....	26
7.1	Pathologie bei Rindern	26
7.1.1	Rinder: Akutes Stadium	26
7.1.2	Rinder: Chronisches Stadium	29
7.1.2.1	Veränderungen der Haut	32
7.1.2.2	Veränderungen der skleralen Konjunktiva und Faszien	34
7.1.2.3	Veränderungen des Gefäßsystems	34
7.1.2.4	Veränderungen der Schleimhäute des Respirationstrakts	34
7.1.2.5	Veränderungen der Organe des Geschlechtsapparats	35
7.2	Pathologie bei Versuchstieren	36
8	Klinik.....	38
9	Diagnostik und Differentialdiagnosen.....	40
9.1	Klinische Diagnostik.....	40
9.2	Serologische Diagnostik	41
9.2.1	IFAT.....	41
9.2.2	ELISA	42

9.2.3	Immunoblots/Westernblots.....	42
9.3	Diagnostik mittels PCR	43
9.4	Diagnostik mittels Histologie und Elektronenmikroskopie.....	43
9.5	Weitere Möglichkeiten der Diagnostik	43
9.5.1	Haut-Ausstrich und Konjunktiva-Geschabsel.....	44
9.5.2	Untersuchung der Tränenflüssigkeit	44
9.5.3	Untersuchung von Blutausstrichen	44
10	Immunhistochemische Untersuchungen an <i>B. besnoiti</i>-Zysten und <i>Besnoitia</i> spp.-Endozoiten	45
11	Behandlung	46
12	Prognose	47
13	Prävention.....	47
III.	MATERIAL UND METHODEN	49
1	Versuchsaufbau und Untersuchungsmaterial	49
1.1	Übertragungsversuch	49
1.1.1	Untersuchungen.....	50
1.1.2	Behandlungen	51
1.1.3	Probenentnahme	51
1.1.4	Probenbearbeitung	52
1.1.4.1	Serum	52
1.1.4.2	Hautproben für die PCR	52
1.1.4.3	Hautproben für die histologische Untersuchung.....	52
1.2	Sektion.....	52
1.3	GKO-Mäuse	53
1.4	Immunhistochemische Kontrollen	53
2	Methoden	54
2.1	Untersuchungsmethoden	54

2.1.1	Status-Untersuchung.....	54
2.1.2	Tages-Untersuchungs-Protokoll.....	55
2.2	Einbettungsverfahren.....	55
2.2.1	Paraffin-Einbettung	55
2.2.2	Kunststoffeinbettung	56
2.3	Schnittanfertigung und Färbung bei der Paraffineinbettung	56
2.3.1	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	57
2.3.2	Giemsa-Färbung	57
2.3.3	PAS-Reaktion	57
2.3.4	Masson-Goldner-Färbung	58
2.4	Schnittanfertigung und Färbung bei der Kunststoffeinfärbung.....	59
2.4.1	Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung.....	59
2.4.2	Giemsa.....	59
2.4.3	PAS-Reaktion	60
2.5	Elektronenmikroskopie	60
2.5.1	Probenvorbereitung.....	60
2.5.2	Anfertigung und Färbung der Semidünnschnitte.....	61
2.5.3	Anfertigung und Kontrastierung der Ultradünnschnitte	61
2.6	Immunhistochemie	61
2.6.1	Anti- <i>Besnoitia</i> -Immunhistochemie	61
2.6.1.1	Immunhistochemie-Protokoll der Paraffinschnitte	62
2.6.1.2	Immunhistochemie-Protokoll der Kunststoffschnitte	63
2.6.1.3	Immunhistochemie-Protokoll der Semidünnschnitte.....	65
2.6.2	Immunhistochemie zellulärer Marker.....	68
2.6.2.1	Allgemeines Protokoll	68
2.6.2.2	Makrophagen-Marker: Anti-Histiozyten-Antigen (MAC387).....	69
2.6.2.3	T-Lymphozyten-Marker: Anti-CD3	70
2.6.2.4	B-Lymphozyten-Marker: Anti-CD20	70
2.6.2.5	Marker mesenchymaler Zellen: Anti-Vimentin.....	70
2.7	Serologie und PCR	71
2.7.1	Serologie.....	71
2.7.2	PCR.....	71

IV. ERGEBNISSE	73
1 Übertragungsversuch	73
1.1 Versuchstier 4.....	74
1.1.1 Klinik	74
1.1.2 PCR und Serologie	76
1.1.3 Histologie.....	77
1.2 Versuchstier 6.....	81
1.2.1 Klinik	81
1.2.2 PCR und Serologie	83
1.2.3 Histologie.....	84
1.3 Versuchstier 8.....	88
1.3.1 Klinik	88
1.3.2 Serologie und PCR	89
1.3.3 Histologie.....	89
1.4 Versuchstier 20.....	90
1.4.1 Klinik	90
1.4.2 Serologie und PCR	91
1.4.3 Histologie.....	93
1.4.4 Elektronenmikroskopie (akutes Stadium)	102
1.5 Versuchstier 22.....	103
1.5.1 Klinik	103
1.5.2 Serologie und PCR	104
1.5.3 Histologie.....	105
1.6 Übersicht der Zystenentwicklung.....	108
2 Sektion.....	109
2.1 Sektion Versuchstier 20.....	109
2.1.1 Makroskopische Befunde	109
2.1.2 Histologische Befunde.....	109
2.2 Sektion Versuchstier 22.....	113
2.2.1 Makroskopische Befunde	113
2.2.2 Histologische Befunde.....	115

2.3	Elektronenmikroskopische Befunde	119
2.3.1	Semidünnschnitte.....	119
2.3.2	Ultrastruktur der Zysten.....	120
2.3.3	Ultrastruktur der Bradyzoiten	122
3	GKO-Mäuse.....	126
3.1	Histologie.....	126
3.2	Elektronenmikroskopie	129
4	Immunhistochemie	133
4.1	Anti- <i>Besnoitia</i> -Immunhistochemie	133
4.2	Immunhistochemie zellulärer Marker.....	134
5	Färbe-Reaktionen.....	136
5.1	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	136
5.2	Färbung nach Giemsa.....	137
5.3	PAS-Reaktion	138
5.4	Masson-Goldner-Färbung	139
5.5	Toluidinblau-Safranin-Färbung.....	139
V.	DISKUSSION	141
1	Histologischer Nachweis der Parasiten	141
1.1	Immunhistochemischer Nachweis	141
1.1.1	Immunhistochemie an Paraffin-Schnitten	141
1.1.2	Immunhistochemie an GMA/MMA- und Semidünnschnitten.....	143
1.2	Färbetechnischer Nachweis	144
2	Lokalisation der Gewebezysten	144
3	Typisierung der Säugetierwirtszelle	145
4	Übertragungsversuch	146
4.1	Möglichkeiten der Ansteckung.....	147
4.2	Schätzung der Infektionszeitpunkte.....	148

4.2.1	Schätzung der Infektionszeitpunkte von Versuchstier 4 und Versuchstier 6	148
4.2.2	Schätzung des Infektionszeitpunktes von Versuchstier 8	150
4.2.3	Schätzung des Infektionszeitpunktes von Versuchstier 20	150
4.2.4	Schätzung des Infektionszeitpunktes von Versuchstier 22	150
4.3	Histologie	151
4.3.1	Extrazystische Signale bei VT20	153
4.4	Serologie und PCR	154
4.5	VT8 - Die subklinische Infektion	155
5	Interpretation der Befunde der GKO-Mäuse	156
6	Elektronenmikroskopie	158
6.1	Elektronendichtes Material in Bradyzoiten	158
6.2	Vergleich der Ultrastruktur von Tachyzoiten und Bradyzoiten	160
7	Histologische Diagnostik bei Verdacht auf bovine Besnoitiose	161
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	163
VII.	SUMMARY	165
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	167
IX.	ANHANG	177
1	Tabellen	177
2	Untersuchungsprotokolle	196
2.1	Status-Untersuchungs-Protokoll	196
2.2	Tages-Untersuchungs-Protokoll	197
3	Fixationsmedien	198
3.1	Paraformaldehyd	198
3.2	6,25%ige Glutardialdehydlösung	198

4	Lösungen für die Herstellung der Kunststoffschritte	198
4.1	Spüllösung	198
4.2	Einbettungsmedium	199
5	Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte	199
5.1	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	199
5.2	70%iges Ethanol	199
5.3	Hämalaun-Eosin-Färbung	199
5.3.1	0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung	199
5.3.2	Eosin-Lösung	199
5.4	Färbung nach Giemsa	200
5.4.1	7%ige Giemsa-Gebrauchslösung	200
5.4.2	0,5%ige Essigsäure	200
5.5	PAS-Reaktion	200
5.5.1	Perjodsäure (1%)	200
5.5.2	0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung	200
5.6	Masson-Goldner-Färbung	201
5.6.1	Weigerts Eisenhämatoxylin	201
5.6.1.1	Lösung A	201
5.6.1.2	Lösung B	201
5.6.2	0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung	201
5.6.3	Rote Farbe-Gebrauchslösung	201
5.6.3.1	Lösung A	201
5.6.3.2	Lösung B	201
5.6.3.3	Azophloxin-Lösung	202
5.6.4	0,5%ige Essigsäure	202
5.6.5	Phosphorwolframphosphorsäure-Orange G	202
5.6.6	Anilinblau	202
6	Lösungen für die Färbung der Kunststoffschritte	202
6.1	Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung	202
6.1.1	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	202
6.1.2	Stammlösung Eosin (SE)	203

6.1.3	Stammlösung Phloxin (SP).....	203
6.1.4	Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung.....	203
6.2	Färbung nach Giemsa.....	203
6.2.1	7%ige Giemsa-Gebrauchslösung.....	203
6.2.2	0,5%ige Essigsäure	203
6.3	PAS-Reaktion	204
6.3.1	Perjodsäure (1%)	204
6.3.2	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	204
7	Lösungen für die Elektronenmikroskopie.....	204
7.1	Probenvorbereitung.....	204
7.1.1	Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,4.....	204
7.1.1.1	Lösung A	204
7.1.1.2	Lösung B	204
7.1.2	Waschlösung	205
7.1.3	Gebrauchsfertiges Fixativ.....	205
7.1.3.1	2%ige Osmiumtetroxidlösung	205
7.1.3.2	Veronalacetat-Puffer pH 10,3	205
7.1.4	Glycidether-Mischung	205
7.1.4.1	Gemisch A.....	205
7.1.4.2	Gemisch B.....	205
7.2	Färbung der Semidünnschnitte	206
7.2.1	Toluidinblau.....	206
7.2.2	Safranin.....	206
7.3	Kontrastierung der Ultradünnschnitte.....	206
7.3.1	2%iges Uranylacetat.....	206
7.3.2	Bleicitrat	206
7.3.2.1	Lösung A	206
7.3.2.2	Lösung B	207
7.3.2.3	Lösung C	207
8	Lösungen für die Immunhistochemie.....	207
8.1	Wasserstoffperoxid-Lösungen	207

8.1.1	1%ige H ₂ O ₂ -Lösung.....	207
8.1.2	1%ige H ₂ O ₂ -Methanol-Lösung.....	207
8.1.3	2%ige H ₂ O ₂ -Lösung.....	207
8.1.4	5%ige H ₂ O ₂ -Lösung.....	207
8.2	0,05 M Tris-Buffer-Saline (TBS) pH 7,6.....	207
8.3	DAB-Gebrauchslösung.....	208
8.4	Natriumäthylat-Lösung	208
8.5	Zitronensäure-Phosphat-Puffer (ZPP) pH 6,0 (nach Lojda, ,Enzymhistochemische Methoden', 1976).....	208
8.5.1	Lösung A	208
8.5.2	Lösung B	209
8.6	0,01 M Citratpuffer pH 6,0	209
8.7	Tris/EDTA-Puffer pH 9,0	209
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	211
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	215
XII.	DANKSAGUNG	217

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest./bidest.	Aqua destillata/bidestillata
AMA1	apical membrane antigen 1
BCS	Body Condition Score
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
BKF	Bösartiges Katarrhalfieber
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
CRFK	Crandell-Rees feline kidney
Ct	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic acid
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
IFT	immunofluorescence test
IFAT	immunofluorescent antibody test
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GKO-Maus	γ -Interferon-Knock-out-Maus
GMA	Glycol Methacrylat
gr.	griechisch
HE	Hämalaun-Eosin
hsp	heat shock protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
i.p.	intraperitoneal
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
Lfd.	Laufende
MAC387	Maus-Klon MAC387
MMA	Methyl Methacrylat
NMRI	Naval Medical Research Institute
Nr.	Nummer
PAS	Periodic acid Schiff
RON	Rhoptry neck protein
ROP	Rhoptry bulb protein
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Temp.	Temperatur
TBS	Tris-Buffer Saline
Vero-Zellen	African green monkey kidney-Zellen
VT	Versuchstier
ZPP	Zitronensäure-Phosphat-Puffer

I. EINLEITUNG

Die bovine Besnoitiose wird hervorgerufen durch *Besnoitia besnoiti*. Der einzellige Parasit wird den *Apicomplexa* und dort den Zysten-bildenden Kokzidien zugeordnet. Der Erreger der parasitären Erkrankung ist im Jahre 1912 erstmalig beschrieben worden, Lebenszyklus und Übertragung von *B. besnoiti* sind jedoch nur unvollständig erforscht. In Analogie zu anderen Zysten-bildenden Kokzidien wird von einem karnivoren Endwirt und einem heteroxenen Zyklus ausgegangen. Innerhalb Europas dienen Rinder dem Parasiten als Zwischenwirte, mit Ausbildung eines akuten und eines chronischen Stadiums der Krankheit. Im chronischen Stadium findet die Ausbildung von Zysten in verschiedenen Organen statt und führt unter anderem zur Ausformung makroskopisch erkennbarer Läsionen in Schleimhäuten und charakteristischen Hautveränderungen.

Berichte über innereuropäische Ausbrüche der bovinen Besnoitiose stammten vor 2008 aus südlicheren Regionen Frankreichs sowie von der iberischen Halbinsel. In den letzten drei Jahren wurden jedoch in Deutschland und Norditalien weitere Ausbrüche vermeldet. Von der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) erfolgte im Jahre 2010 eine Einstufung der Krankheit als „emerging disease“.

Untersuchungen zum Verlauf der bovinen Besnoitiose stammen aus den sechziger und siebziger Jahren und wurden überwiegend an experimentell infizierten Tieren durchgeführt. Eine Studie mit umfassender klinischer, pathomorphologischer und histologischer Beschreibung des Verlaufs der Erkrankung nach natürlicher Infektion, liegt so bisher nicht vor.

Ziel der Arbeit ist es, die klinischen, pathomorphologischen und histologischen Veränderungen im akuten und chronischen Stadium der bovinen Besnoitiose nach natürlicher Infektion zu beschreiben.

Aus diesem Grund wurde ein Übertragungsversuch mit Rindern durchgeführt. Naive Fleckviehrinder wurden gemeinsam mit chronisch infizierten Limousinrindern auf einer Weide gehalten, intensiv beobachtet und engmaschig beprobt. Neben der detaillierten Dokumentation der klinischen Veränderungen bei mit *B. besnoiti* infizierten Rindern ermöglichte diese Studie die histologische und ultrastrukturelle Darstellung von Tachyzoiten, Bradyzoiten und Gewebezysten von *B. besnoiti* in der Rinderhaut.

Für die Darstellung der Tachyzoiten, die in der Routinefärbung nur sehr schwer nachzuweisen sind, wurde eine immunhistochemische Methode an Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material etabliert. Tachyzoiten aus Organen experimentell mit *B. besnoiti* infizierter γ -Interferon-Knock-out-Mäuse (GKO-Mäuse) wurden als Positiv-Kontrolle für die Etablierung der Immunhistochemie verwendet. Ferner diente die Ultrastruktur der *B. besnoiti*-Tachyzoiten aus den GKO-Mäusen als Vorlage für das Erkennen und die Beschreibung der *B. besnoiti*-Tachyzoiten in der Rinderhaut.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Allgemeines

1.1 Definitionen und Synonyme

Die bovine Besnoitiose ist eine Infektionskrankheit, die durch den einzelligen Parasiten *Besnoitia besnoiti* hervorgerufen wird. Sie tritt vor allem als Erkrankung mit chronischem Verlauf und Zystenbildung im Zwischenwirt Rind in Erscheinung.

Synonyme für die bovine Besnoitiose sind überwiegend historische Bezeichnungen, die sich hauptsächlich an der klinischen Symptomatik orientierten. Von Besnoit und Robin wurde sie als kutane Sarcosporidiose bezeichnet, wahrscheinlich in Anlehnung an die entfernte Ähnlichkeit histologisch erkennbarer Zysten mit denen der *Sarcocystis* spp.. Für das chronische Stadium waren Begriffe wie Elefantenhautkrankheit oder Elephantiasis (de boeuf) und kutane oder Haut-Globidiose der Rinder gebräuchlich. Begriffe wie Anasarque de bovines beziehen sich auf das akute Stadium der Erkrankung.

In dieser Arbeit werden Begriffe, welche Parasitenstadien und deren Vermehrung beschreiben, gemäß den folgenden Definitionen verwendet (Eckert *et al.* 2008):

Bradyzoiten (griechisch [gr.] *bradys* = langsam, gr. *zoein* = leben) sind Zystozoen von *Apicomplexa*, die sich langsam in Zysten durch Endodyogenie vermehren.

Endodyogenie (gr. *endon* = innen, gr. *dyo* = zwei, gr. *gennan* = erzeugen) ist eine Form der Merogonie, bei der in einer Mutterzelle durch Sprossung des Zellkerns und Bildung von apikalen Komplexen zwei Tochterzellen entstehen.

Endozoiten (gr. *endon* = innen, gr. *zoein* = leben) sind Zoiten, die durch Endodyogenie oder Endopolygenie entstanden sind.

Merogonie (gr. *meros* = Teil, gr. *goneia* = Zeugung) ist eine Form der Schizogonie (Vielteilung) bei *Apicomplexa*, bei der sich eine Mutterzelle (Meront = Vielteilungskörper) in Tochterzellen teilt. Sonderformen der Merogonie sind Endodyogenie und Endopolygenie.

Merozoiten (gr. *meros* = Teil, gr. *zoein* = leben) sind Parasitenstadien, die durch Merogonie entstehen.

Tachyzoiten (gr. *tachys* = schnell, gr. *zoein* = leben) sind Endozoiten von *Apicomplexa*, die sich intrazellulär durch schnelle Teilungsvorgänge vermehren.

Zystozoiten (gr. *kystis* = Blase, gr. *zoein* = leben) sind Merozoiten, die in Gewebezysten durch Endodyogenie gebildet werden.

Weitere Begriffsdefinitionen:

Anasarka bezeichnet ein ausgedehntes Ödem.

Die Begriffe „Parasit“, „Tachyzoit“, „Bradyzoit“ und „Zystozoit“ bezeichnen im folgenden *B. besnoiti* und die entsprechenden Stadien von *B. besnoiti*. Endozoiten anderer *Apicomplexa* sind eindeutig als solche gekennzeichnet.

Routinefärbungen sind Hämalaun-Eosin-Färbung (HE), Färbung nach Giemsa (Giemsa) und die Periodic Acid Schiff-Reaktion (PAS).

Skleroderma/-dermie: Da aus den zitierten Texten eine eindeutige Definition durch die jeweiligen Autoren nicht hervorgeht, wird davon ausgegangen, dass die Autoren Skleroderma/-dermie im ursprünglichen Wortsinn (gr. *scleros* = hart, gr. *derma* = Haut) verwenden und sich nicht auf die systemische Autoimmunerkrankung der Haut des Menschen beziehen.

Wirtszelle bezeichnet die vom Parasiten befallene Säugetierzelle.

1.2 Geschichte

Die Krankheit findet bereits im frühen 19. Jahrhundert in Frankreich Erwähnung (Férrie 1984). Erst im Jahre 1912 wurde für die als Elefantenhautkrankheit der Rinder bekannte Erkrankung eine parasitäre Ursache identifiziert und die histologisch erkennbaren Parasitenzysten in der Rinderhaut als kutane Sarcosporidiose beschrieben (Besnoit und Robin 1912). Pols (1960) gibt einen sehr detaillierten Abriss über die Namensgebung von der Entdeckung bis zum damaligen Zeitpunkt. Es sei erwähnt, dass für den Parasit noch im selben Jahr *Sarcocystis besnoiti* als Bezeichnung vorgeschlagen wurde, im darauffolgenden Jahr wurde die Gattung *Besnoitia* generiert und der Erreger als *Besnoitia besnoiti* bezeichnet.

1.3 Bedeutung

Unter Berücksichtigung von Tierschutzaspekten ist die bovine Besnoitiose von Bedeutung, da die Tiere sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium schwere Krankheitsverläufe mit hochgradiger Störung des Allgemeinbefindens erleiden können (EFSA-Statement 2010).

Die Höhe der wirtschaftlichen Verluste durch die Krankheit kann nicht eindeutig festgelegt werden (EFSA-Statement 2010). Es gibt unterschiedliche Zahlen bezüglich Morbidität und Letalität. Eine Letalität von bis zu 10 % und eine Morbidität von bis zu 80 % sind beschrieben (Pols 1960; Bigalke 1968). Ökonomische Verluste in endemischen Gebieten entstehen durch die Mortalität, Gewichtsverluste, Beeinträchtigungen der männlichen Fruchtbarkeit, Reduktion der Milchleistung, Verminderung der Hautqualität für die Herstellung von Leder und Verwerfung gesamter Schlachtkörper oder vermehrtes Trimmen (Pols 1960; Cortes *et al.* 2003; Cortes *et al.* 2005).

2 Der Parasit

2.1 Klassifikation

B. besnoiti ist ein obligat intrazellulärer Parasit und wird zum Unterstamm *Apicomplexa* und dort den Zysten-bildenden Kokzidien zugeordnet. Es gibt verschiedene Schemata zur taxonomischen Klassifikation der *Apicomplexa* nach phänotypischen Kriterien (Kaya 2001; Tenter *et al.* 2002), diese unterscheiden sich je nach Autor zum Teil erheblich. Meist sind die vorgeschlagenen Schemata jedoch ab der Ebene der Familien einheitlich. Im Folgenden die Einteilung nach Tenter und Schnieder (Tenter und Schnieder 2006):

Stamm: *Alveolata*

Unterstamm: *Apicomplexa*

Klasse: *Coccidia*

Unterklasse: *Eucoccidia*

Ordnung: *Eimeriida*

Familie: *Sarcocystidae*

Unterfamilie: *Toxoplasmatinae*

Genus: *Besnoitia*

Spezies: *B. besnoiti*

Die Familie *Sarcocystidae* besteht aus zwei Unterfamilien: *Sarcocystinae* und *Toxoplasmatinae*. Die Unterfamilie *Toxoplasmatinae* umfasst mit dem Genus *Besnoitia* weitere eng verwandte Genera wie *Toxoplasma*, *Neospora* und *Hammondia*.

2.2 Genus *Besnoitia*

Dem Genus *Besnoitia* gehören zum jetzigen Zeitpunkt zehn Spezies an: *B. akodoni*, *B. bennetti*, *B. besnoiti* (namensgebende Spezies), *B. caprae*, *B. darlingi*, *B. jellisoni*, *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi*, *B. tarandi* und *B. wallacei* (Dubey et al. 2003b; Dubey et al. 2004; Dubey et al. 2005; Dubey und Yabsley 2010). Sie parasitieren bei Nagern, Equiden, Rindern, Gnus, Antilopen, Ziegen, Opossums, Kaninchen, Echsen und Rentieren. Bislang ist nur bei den vier Spezies *B. darlingi*, *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi* und *B. wallacei* der Endwirt, die Katze, bekannt (Dubey und Yabsley 2010).

2.3 Morphologie

B. besnoiti besitzt im Zwischenwirt zwei Stadien: Tachyzoiten und Bradyzoiten. Tachyzoiten replizieren rapide und vermehren sich unter anderem in Endothelzellen und möglicherweise in Makrophagen (Bigalke 1970, 1981). Bradyzoiten replizieren langsam, wahrscheinlich in Makrophagen und/oder Fibroblasten und bilden Gewebezysten (Bigalke 1981; Majzoub et al. 2010).

2.3.1 Organellen apikomplexer Parasiten

Tachyzoiten und Bradyzoiten apikomplexer Parasiten enthalten unter anderem nachfolgend aufgeführte Zell-Organellen. Schemazeichnungen der Endozoiten mit Organellen befinden sich auf den Seiten 9 und 11.

2.3.1.1 Rhoptrien

Rhoptrien sind lange keulenförmige Organellen, die mit ihrem dünnen Ende bis in das Innere des Konoids reichen und mit dem apikalen Teil des Pellicle verbunden sind. Ihre Anzahl

variiert je nach Spezies im Unterstamm *Apicomplexa*. Bei *T. gondii* stellen sich die Rhoptrien der Tachyzoiten am keulenförmigen Ende labyrinthisch dar, die der Bradyzoiten elektronendichter (Dubey *et al.* 1998). Der Inhalt der Rhoptrien besteht aus Lipiden und Proteinen, letztere werden im Endoplasmatischen Retikulum gebildet. Unterschieden werden sogenannte „rhoptry neck proteins“ (RON), Proteine, die am dünnen Ende gefunden werden können und „rhoptry bulb proteins“ (ROP), die am aufgetriebenen Ende gefunden werden können. Das keulenförmige Ende der Rhoptrien enthält zudem noch Proteasen und zahlreiche bislang nicht identifizierte Proteine. Die Bildung der sogenannten „moving junction“ (siehe Abschnitt 2.5 Wirtszell-Invasion, S. 13) wird mit den RONs assoziiert. ROPs werden in die parasitophore Vakuole oder in das Wirtszellzytoplasma sezerniert, die zurückbleibenden leeren Organellen können elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Nichols *et al.* 1983). Rhoptrienproteine können daraufhin in der Membran der parasitophoren Vakuole gefunden werden (Dubremetz *et al.* 1998; Blackman und Bannister 2001; de Souza 2008; Proellocks *et al.* 2010; Santos und Soldati-Favre 2011).

2.3.1.2 Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat

Alle pathogenen Protozoen enthalten ein Endoplasmatisches Retikulum. Die Organisation zu einem Golgi-Apparat ist jedoch nicht bei allen gegeben (de Souza 2008). Im Endoplasmatischen Retikulum werden unter anderem apikale Proteine synthetisiert und über den Golgi-Apparat an ihren zellulären Bestimmungsort gebracht (Blackman und Bannister 2001; de Souza 2008).

2.3.1.3 Dichte Granula

Dichte Granula sind Membran-gebundene, runde Organellen, die im Gegensatz zu den apikalen Organellen über den gesamten Parasiten verteilt sind. Sie enthalten hohe Konzentrationen an Proteinen und erscheinen elektronendicht im elektronenmikroskopischen Bild. Während des Invasionsprozesses werden die Proteine, unter anderem Phosphatasen, in die parasitophore Vakuole sezerniert. Sie nehmen Teil an der Bildung des tubulären Netzwerks innerhalb der parasitophoren Vakuole und werden teilweise auch in deren Membran integriert (Dubremetz *et al.* 1998; Blackman und Bannister 2001; Morrisette und Sibley 2002; de Souza 2006, 2008).

2.3.1.4 Konoid

Das Konoid besteht aus spiralg angelegten Filamenten, die entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind und eine stumpfkegelförmige Struktur bilden. Es sitzt am apikalen Ende apikomplexer Parasiten. Das Konoid kann ein- und ausgefahren werden und spielt möglicherweise eine mechanische Rolle beim Invasionsprozess (Dubey *et al.* 1998; Morrisette und Sibley 2002).

2.3.1.5 Mikronemen

Mikronemen sind stäbchenförmige, elektronendichte Organellen, die auf das apikale Drittel des Zytoplasmas verteilt sind. In manchen Spezies sind sie die am häufigsten zu findenden Organellen im Zytoplasma. Sie enthalten eine ähnlich große Anzahl an Proteinen wie Rhoptrien. Viele Mikronemen-Proteine besitzen Transmembran-Domänen oder Glykolipid-Anker, andere hingegen besitzen Adhäsionsmolekül-artige Ektodomänen die Integrinen oder Zelladhäsionsmolekülen von Vertebraten ähneln. Sie spielen eine wichtige Rolle während des Invasionsprozesses und der Bewegung apikomplexer Parasiten (Blackman und Bannister 2001; Morrisette und Sibley 2002; de Souza 2006, 2008).

2.3.1.6 Apicoplast

Apicoplast ist die Abkürzung für „apikomplexes Plastid“. Dabei handelt es sich um ein von mehreren Membranen umgebenes Zellorganell, das sich in der Nähe des Nukleus befindet. Das Apicoplast wurde früher als Golgi-Adjunct oder Hohlzylinder beschrieben. Bei *T. gondii* enthält es zirkuläre, extra-chromosomale DNA (de Souza 2008).

2.3.2 *B. besnoiti*-Tachyzoiten

B. besnoiti-Tachyzoiten sind von komma- oder birnenförmiger Gestalt. Ihre Größe variiert zwischen $1,5\text{-}3,8 \times 4,5\text{-}8,6 \mu\text{m}$ (Bigalke 1981; Dubey *et al.* 2003b).

Die Ultrastruktur der Tachyzoiten ähnelt derjenigen der Bradyzoiten (Shkap *et al.* 1988). Sie besitzen typische apikomplexe Merkmale: Konoid, dichte Granula, Rhoptrien und Mikronemen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Bradyzoiten sind die Mitochondrien deutlich sichtbar (Cortes *et al.* 2006c).

Göbel und Mitarbeiter infizierten Vero- und CRFK-Zellen mit Bradyzoiten von *B. besnoiti*. Sie beobachteten sowohl rasch als auch langsam replizierende Stadien in beiden Zellkulturen.

Die Merozoiten vermehren sich intrazellulär via Endodyogenie. Sie besitzen Rhoptrien, Mikronemen, Nuklei und ein Golgi-Adjunct (Apicoplast), zwei anteriore polare Ringe und zwei präkonoidale Ringe (siehe **Abbildung II-1**). Die Größe der Merozoiten beträgt $1,5-3,7 \times 8,5-8,6 \mu\text{m}$ (Göbel *et al.* 1985).

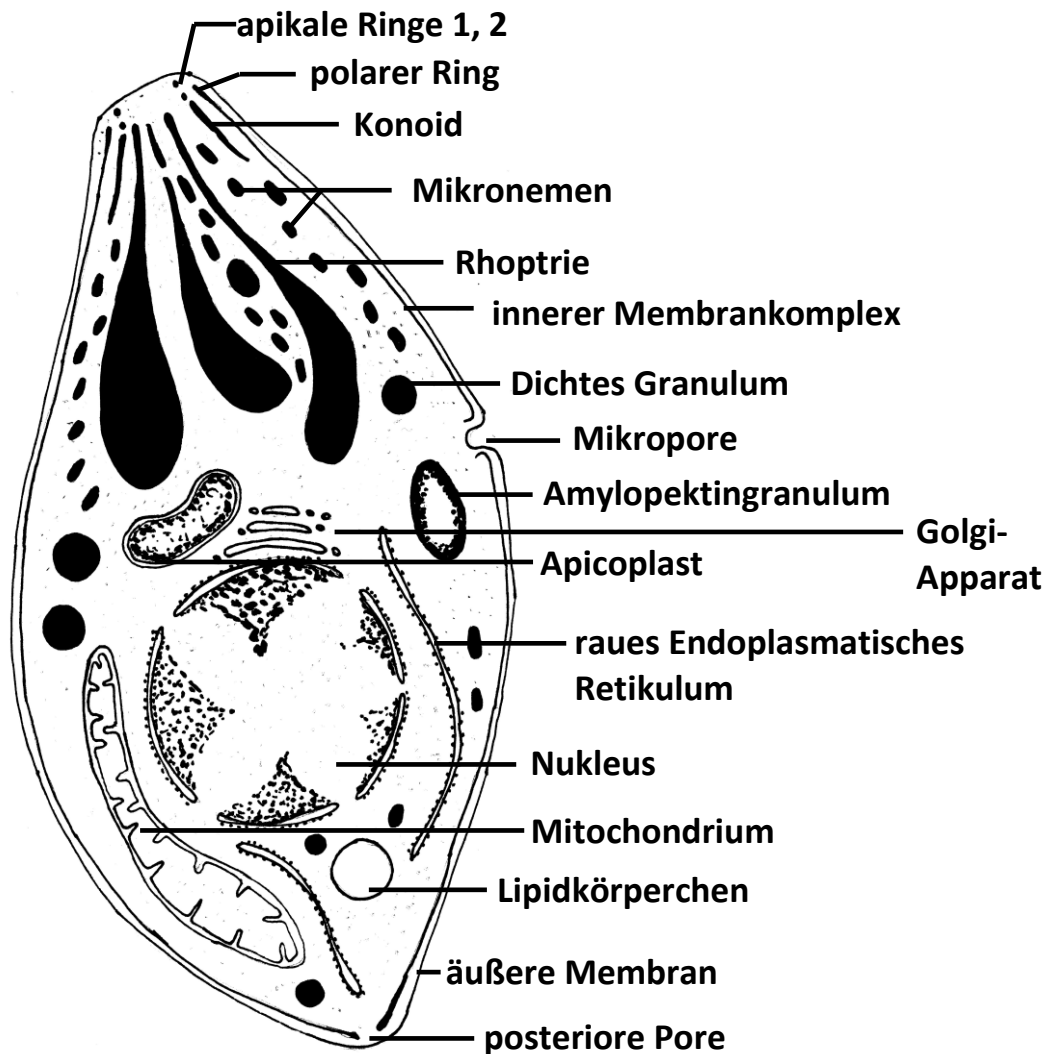


Abbildung II-1: Schema eines Tachyzoiten von *B. besnoiti*.

Bei *B. bennetti* und *B. tarandi* wurden bei Tachyzoiten der gleiche Aufbau gefunden wie bei Bradyzoiten, jedoch enthielten sie keine Amylopektingranula (Dubey *et al.* 2004; Dubey *et al.* 2005).

Bei *T. gondii* sind Tachyzoiten etwas plumper und nicht so schlank wie Bradyzoiten, enthalten mehr Rhoptrien und weniger oder keine Amylopektingranula, und ihr Kern ist mehr zentral lokalisiert (Dubey *et al.* 1998; Speer *et al.* 1999).

Bei *N. caninum* enthalten Tachyzoiten weniger Amylopektingranula als Bradyzoiten und besitzen mehr Rhoptrien (Speer *et al.* 1999).

2.3.3 *B. besnoiti*-Bradyzoiten

B. besnoiti-Bradyzoiten zeigen eine komma- oder bananenförmige Gestalt, sind bis zu 10 µm lang und bis zu 3,7 µm breit. Sie besitzen ein zugespitztes „vorderes“ Ende, an dem sich der apikale Komplex befindet und ein abgerundetes „hinteres“ Ende.

Bradyzoiten sind begrenzt von einer dreischichtigen Membran (Pellicle), die äußere Membran umgibt den gesamten Parasiten, die zwei inneren Membranen sind am hinteren und vorderen Ende unterbrochen und bilden dort den polaren Ring. Im vorderen Drittel des Parasiten finden sich sogenannte Mikroporen, die aus einer Einfaltung der äußeren Membran und einer Verdickung der inneren Membran (äußere zylindrische Struktur) gebildet werden. Am vorderen „konoidalen“ Ende befinden sich Konoid, polarer Ring, 22 subpellikuläre Mikrotubuli als Bestandteile des Zytoskeletts, und die Ausführungsgänge der Rhoptrien (siehe **Abbildung II-2**, S. 11). In einem Bradyzoiten-Anschnitt lassen sich bis zu acht Rhoptrien und 70 Mikronemen nachweisen, der Kern ist im mittleren oder hinteren Drittel zu finden. Weitere Organellen sind Amylopektingranula, Lipidkörperchen, Mitochondrien, dichte Granula, Apicoplast und Golgi-Apparat (Bigalke 1981; Göbel *et al.* 1985; Shkap *et al.* 1988; Njenga *et al.* 1995; Dubey *et al.* 2003a; Fernandez-Garcia *et al.* 2009; Mehlhorn *et al.* 2009; Majzoub *et al.* 2010).

2.3.4 Gewebezysten von *B. besnoiti*

Gewebezysten von *B. besnoiti* sind in der skleralen Konjunktiva schon mit bloßem Auge als weißliche Herde erkennbar (Bigalke 1968). Im histologischen Schnitt stellen sich die Zysten als rundliche Gebilde mit einem Durchmesser von 250-390 µm dar (Basson *et al.* 1970; Majzoub *et al.* 2010). Die Zystenwand wird klassischerweise in drei Schichten unterteilt:

Eine äußere hyaline Schicht, auch sekundäre Zystenwand genannt, die sich in der HE-Färbung als blass-rosa darstellt und ca. 10-15 µm dick ist. Elektronenmikroskopisch stellt sie sich als zellfreie Schicht dar, die aus zirkulär oder unregelmäßig verlaufenden Kollagenfibrillen besteht.

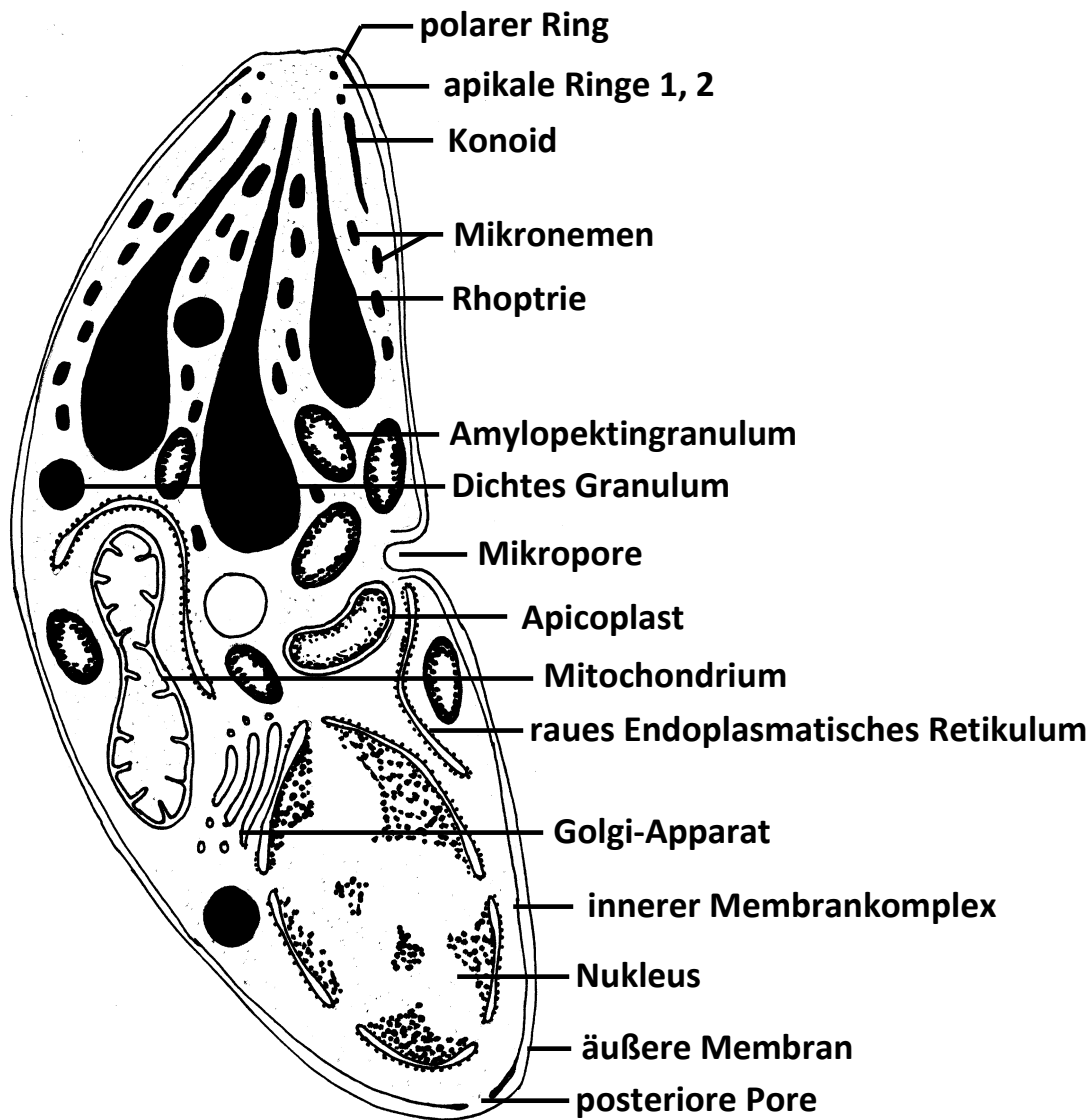


Abbildung II-2: Schema eines Bradyzoiten von *B. besnoiti*.

Eine mittlere zelluläre Schicht, die aus der Säugetierwirtszelle – auch Zystenwandzelle genannt – besteht, 5-10 µm dick ist und zahlreiche hypertrophierte Wirtszellkerne beinhaltet (siehe **Abbildung II-3**). Zahlreiche Zytoplasma-Ausläufer der Wirtszelle ragen in die äußere hyaline Schicht. Das Zytoplasma beinhaltet Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Lysosomen. Die Zellkerne sind unregelmäßig geformt mit tiefen Membraneinfaltungen und zeigen die typische Struktur von Zellkernen mit doppelter Membran und Poren.

Die innere Schicht der Zystenwand besteht aus der Membran der parasitophoren Vakuole, die sich elektronenmikroskopisch einerseits als einfache deutlich abgrenzbare Membran darstellt, andererseits jedoch undeutliche vesikuläre Strukturen zeigt, die sich auf der Innenseite als dichte Lage sammeln. In einer Zyste, und damit in einer Wirtszelle, können bis

zu drei parasitophore Vakuolen zu finden sein. Innerhalb der parasitophoren Vakuole befinden sich die Bradyzoiten (Dubey *et al.* 2003a; Mehlhorn *et al.* 2009; Majzoub *et al.* 2010).

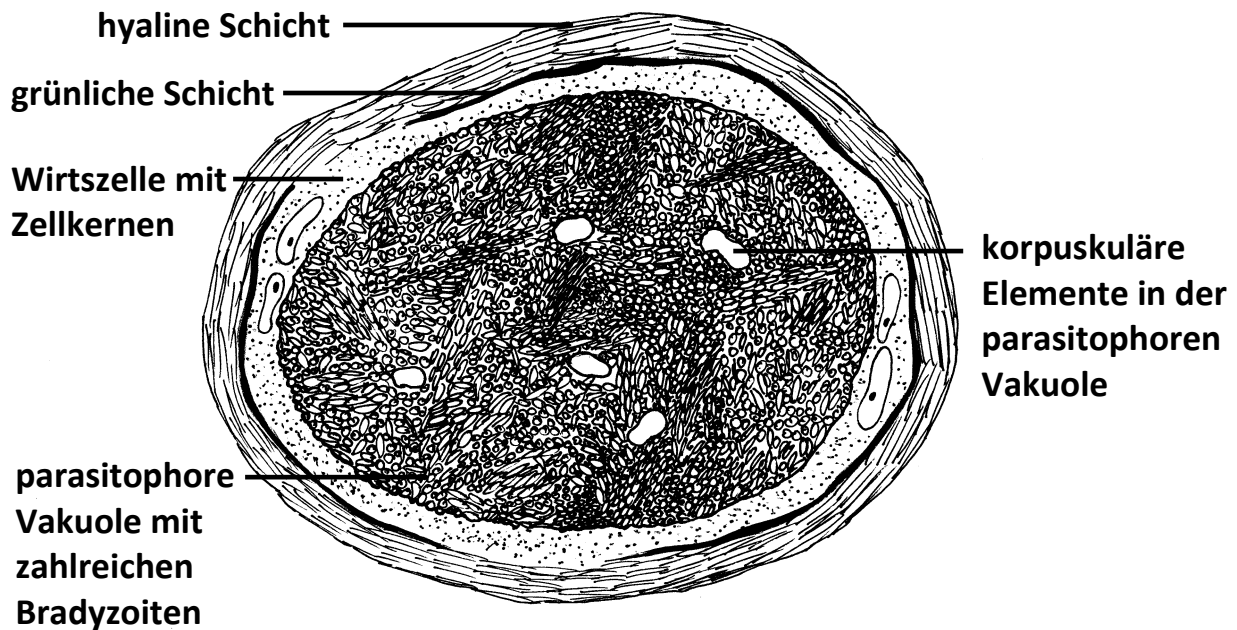


Abbildung II-3: Schema einer Gewebezyste von *B. besnoiti*.

2.4 Motilität

In Vero-Zellkulturen sind Bradyzoiten von *B. besnoiti* beweglich und zeigen Bewegungsmuster wie „circular gliding“, „helical gliding“ und „upright twirling“ (Cortes *et al.* 2006c). Die Bewegungsformen „flexing“ und „gliding“ konnten auch in BHK- und HeLa-Zellen sowie in Vero-Zellen beobachtet werden (Neuman 1974; Njagi *et al.* 2007). „Gliding“ ist ein typisches Bewegungsmuster und kann auch bei anderen apikomplexen Parasiten beobachtet werden. Es ist entscheidend für die Etablierung einer Infektion, da es dem Parasiten ermöglicht, biologische Barrieren zu überwinden, in Wirtszellen einzudringen und aus diesen zu entkommen (Dubey *et al.* 1998; Soldati-Favre 2008).

2.5 Wirtszell-Invasion

Eine Wirtszelle wird von apikomplexen Parasiten aktiv über den nachfolgend dargestellten Invasionsprozess infiziert. Das aktuelle Wissen über die Wirtszellinvasion von apikomplexen Parasiten stammt hauptsächlich aus Forschungsarbeiten über *T. gondii* und *Plasmodium* spp. (Dubremetz *et al.* 1998; Blackman und Bannister 2001; Soldati *et al.* 2004; Soldati-Favre 2008; Proellocks *et al.* 2010; Santos und Soldati-Favre 2011).

Der Invasionsprozess ist komplex und besteht aus mehreren Schritten: 1. Reversible Anhaftung an die Wirtszelle, 2. Re-Orientierung des Parasiten, um die apikalen Organellen an der Wirtszellmembran zu positionieren und 3. Irreversible Anhaftung und Bildung der „moving junction“ und 4. Eindringen in die Wirtszelle.

1. Wahrscheinlich findet die initiale reversible Anhaftung über Oberflächenproteine des Parasiten statt (Proellocks *et al.* 2010).
2. Sobald der Parasit an der Wirtszellmembran haftet, findet eine Re-Orientierung statt, um die apikalen sekretorischen Organellen (Rhoptrien, Mikronemen) in Kontakt mit der Wirtszellmembran zu bringen.
3. Nach der Re-Orientierung werden die Inhalte der sekretorischen Organellen entleert: Die Mikronemen sezernieren ihren Inhalt zuerst, gefolgt von den Rhoptrien. Die RONS bilden zusammen mit dem mikronemalen Protein AMA1 die „moving junction“. Die „moving junction“ ist eine zirkuläre Anhaftungszone am Beginn der Invagination der Wirtszelle. Sie ist charakterisiert durch eine Verdickung der Wirtszellmembran mit erhöhter Elektronendichte. Sehr häufig kann an dieser Stelle eine Einschnürung des Parasitenleibes beobachtet werden. Offenbar verhindert die „moving junction“ auch das Integrieren von Wirtszelloberflächenproteinen in die Membran der parasitophoren Vakuole.
4. Das Eindringen in die parasitophore Vakuole erfolgt durch „Überziehen“ der Wirtszellmembran über den Parasitenleib.

Die Wirtszellinvasion durch *B. besnoiti* ist nicht vollständig geklärt, jedoch gibt es sowohl Hinweise auf einen aktiven Invasionsprozess als auch auf passive Aufnahme durch Phagozytose (Shkap *et al.* 1988).

Einige Arbeiten beschäftigten sich mit der Interaktion von *B. besnoiti*-Tachyzoiten mit Vero-Zellen in Zellkultur. Die Daten der Autoren legen nahe, dass es sich dabei um aktive Zell-Zell-

Interaktionen und aktive Zellpenetration des Parasiten handelt (Reis *et al.* 2006; Njagi *et al.* 2007). Die Ergebnisse rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen von in Zellkultur gehaltenen *B. besnoiti*-Endozoiten unterstützen diese These, da eine Invagination der Wirtszellmembran verursacht vom vorderen Ende der Parasiten beobachtet wurde (Shkap *et al.* 1988).

B. besnoiti-Endozoiten können auch über Phagozytose in eine Zelle aufgenommen werden (Neuman 1974). Ob sie sich innerhalb der phagozytischen Vakuole auch vermehren ist in der Literatur nicht beschrieben.

2.6 Intrazelluläre Multiplikation

Tachyzoiten, Bradyzoiten und in Vero- oder CRFK-Zellkultur gehaltene Endozoiten von *B. besnoiti* vermehren sich in intrazellulären parasitophoren Vakuolen via Endodyogenie (Bigalke 1970; Göbel *et al.* 1985; Tenter *et al.* 2002; Mehlhorn *et al.* 2009).

Göbel und Mitarbeiter beobachteten den Verlauf der Endodyogenie der in Vero- und CRFK-Zellkultur gehaltenen Endozoiten: Aus einer Mutterzelle entstehen zwei Tochterzellen. Die Endodyogenie beginnt mit der Ausbildung von nukleären Spindeln direkt unter der Kernmembran der Mutterzelle, im Zytoplasma sind den Spindeln gegenüberliegende Zentriolen erkennbar. Über den Zentriolen bildet sich eine konkave Membran, aus der die inneren Membranen der Merozoiten-Anlagen entstehen. Das Konoid, die Strukturen des apikalen Komplexes, die Mikronemen und Rhoptrien werden danach als erstes gebildet. Die Membranen der Merozoiten strecken sich und separieren das Zytoplasma der Mutterzelle, das am hinteren Ende die beiden Tochterzellen noch miteinander verbindet. Die Trennung der beiden Tochter-Merozoiten erfolgt durch Einfaltung der äußeren Membran, des Pellicle. Die äußere Pellicle-Membran der Mutterzelle bildet die entsprechende Membran der Merozoiten. Die jungen Merozoiten bleiben über eine dünne Zytoplasma-Brücke miteinander verbunden. Weitere Endodyogenien, ohne vollständige Teilung der Tochter-Merozoiten, finden in einer parasitophoren Vakuole statt, so dass mehr als zwei Merozoiten gefunden werden können, die über einen gemeinsamen Residualkörper verbunden sind (Göbel *et al.* 1985).

2.7 Lebenszyklus und Wirte

Zyklus und Endwirt von *B. besnoiti* sind nicht bekannt. Es wird jedoch in Analogie zu anderen Zysten-bildenden Kokzidien angenommen, dass es sich um einen heteroxenen Zyklus handelt. Rinder und andere wildlebende Boviden (Antilopen, Gnus) fungieren als Zwischenwirte, in denen die asexuelle Vermehrung und Zystenbildung stattfinden. In einem karnivoren Endwirt würden die sexuelle Vermehrung und die Ausscheidung von Oozysten ablaufen (siehe **Abbildung II-4**, S. 16). Zwischenwirte würden dann durch orale Aufnahme von sporulierten Oozysten infiziert, die darin enthaltenen Sporozoiten differenzieren sich zu Tachyzoiten und invadieren die Zellen des Zwischenwirtes (Olias *et al.* 2011).

Zudem besteht noch die Möglichkeit, dass es sich bei Rindern um Fehlwirte handelt und von einem wildlebenden Zwischenwirt, der als Reservoir dient, Infektionen der Hauswiederkäuer ausgehen (Kiehl *et al.* 2010; Basso *et al.* 2011). *B. besnoiti*-Stämme, die bei Streifengnus, Impalas und Kudus isoliert wurden, besitzen eine niedrige Pathogenität bei Rindern. Manche Autoren betrachten wilde Klauentiere deshalb nicht als relevante Reservoir für domestizierte Rinder. Eine klinische Erkrankung, hervorgerufen durch *B. besnoiti*, wurde bei wilden Klauentieren noch nicht beschrieben (Leighton und Gajadhar 2001).

Über mögliche Endwirte gibt es unterschiedliche Angaben:

Eine Arbeit aus Kasachstan identifiziert Haus- und Wildkatzen als Ausscheider von *B. besnoiti*-Oozysten nach oraler Aufnahme von Unterhaut und Aponeurosen eines chronischen infizierten Rindes, welche zahlreichen Gewebezysten enthielten (Peteshev *et al.* 1974).

Bei Infektionsversuchen, die in Uganda stattfanden, wurden bei Hunden und Katzen nach Verfütterung zystenhaltiger Haut Oozysten im Kot gefunden, jedoch konnten diese nicht näher identifiziert werden. Nach Verfütterung zystenhaltiger Haut an Marabus und Zwerggänsegeier konnten im Kot keine Protozoenstadien nachgewiesen werden (Rommel 1975).

Diesing und Mitarbeiter versuchten diverse Säuger-Spezies (Gattungen der Familien: *Felidae* und *Canidae* sowie Mungos), mehrere Schlangen und einen Weißrückengeier durch orale Gabe von Muskulatur und Bindegewebe, welche zahlreiche *B. besnoiti*-Zysten enthielten zu infizieren. Keines der Tiere schied jedoch *B. besnoiti*-Oozysten aus (Diesing *et al.* 1988).

Auch in neueren Versuchen konnte nach oraler Verabreichung von *B. besnoiti*-Tachyzoiten aus Zellkultur und *B. besnoiti* Bradyzoiten aus der Haut eines natürlich infizierten Rindes

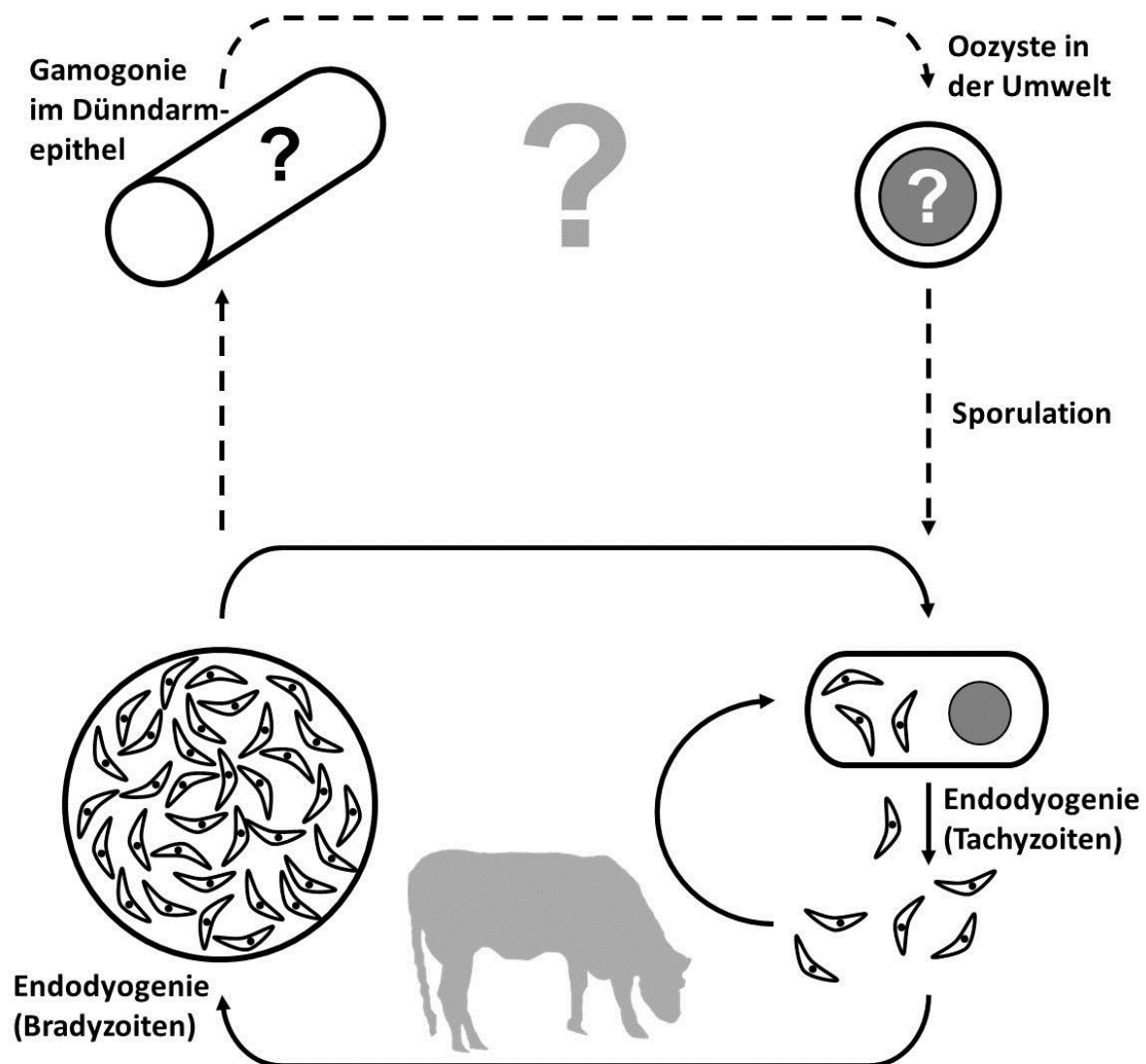


Abbildung II-4: Schematische Darstellung des Zyklus von *B. besnoiti*. Die unterbrochenen Pfeile stellen den Teil des Zyklus dar, der nicht hinreichend geklärt ist.

keine Oozystenausscheidung bei Katzen und Hunden beobachtet werden (Basso *et al.* 2011). Zwei von drei Katzen entwickelten jedoch Antikörper gegen *B. besnoiti*; sie scheinen daher empfänglich für eine Infektion zu sein.

Diverse Spezies lassen sich experimentell subkutan oder intraperitoneal mit *B. besnoiti* infizieren, unter anderem Feldmäuse (*Microtus arvalis*), Gerbils (*Meriones tristrami*, *Meriones unguiculatus*), Meerschweinchen (*Cavia porcellus*), Hamster, Sandratten (*Psammomys obesus*) und verschiedene Stämme von Labormäusen, unter anderem NMRI-

Mäuse und GKO-Mäuse (Bigalke 1968; Shkap *et al.* 1987a; Schares *et al.* 2009; Basso *et al.* 2011). Diese Versuchstiere zeigten eine Vermehrung der Parasiten in Endothelzellen und Zellen des blutbildenden Systems, eine Zystenbildung konnte hingegen nicht beobachtet werden (Schares *et al.* 2009; Basso *et al.* 2011). Eine Zystenbildung ist bisher nur bei experimentell mit *B. besnoiti* infizierten Kaninchen beschrieben worden (Bigalke 1968; Basson *et al.* 1970).

2.8 Zoonotisches Potential

Infektionen mit *B. besnoiti* sind beim Menschen nicht beschrieben (EFSA-Statement 2010).

Janitschke und Mitarbeiter untersuchten 164 menschliche Seren mittels IFT auf Antikörper gegen *B. besnoiti*, konnten jedoch keine Antikörper gegen *B. besnoiti* nachweisen (Janitschke *et al.* 1984).

3 Epidemiologie

3.1 Seroprävalenz

Studien zur Seroprävalenz wurden hauptsächlich in Südafrika, Israel und Spanien durchgeführt.

Goldman und Pipano untersuchten Seren von Milch- und Fleischrinderrassen in Israel mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Antikörper gegen *B. besnoiti*. Bei 1500 Fleischrindern wurden bei 53% Antikörper nachgewiesen, die Seroprävalenz lag bei weiblichen Tieren bei 60%, bei männlichen bei 43%. Von 377 Milchrindern waren 93% seronegativ. Die Unterschiede in den Prävalenzen zwischen den Nutzungsformen sind möglicherweise in der Art der Tierhaltung begründet (Goldman und Pipano 1983).

Janitschke und Mitarbeiter untersuchten Seren von Rindern aus drei Farmen in Südafrika mit ELISA und IFT. Von 303 Seren waren 54,5% positiv im ELISA und 61,7 % positiv im IFT. Von den Tieren, die keine sichtbaren Zysten in der skleralen Konjunktiva zeigten, waren 45,7% im ELISA und 49,5% im IFT positiv (Janitschke *et al.* 1984).

Bei einem Ausbruch von boviner Besnoitiose in Zentralspanien waren von 351 weiblichen Tieren 90,8% seropositiv und fünf Bullen von sieben. Nur 43,2% der Tiere zeigten mindestens ein klinisch erkennbares Zeichen einer akuten oder chronischen Infektion. Fünf klinisch auffällige Tiere von 358 waren seronegativ im ELISA (Fernández-García *et al.* 2010). Dieser Befund wurde auch von anderen Autoren berichtet (Schaes *et al.* 2010). In der gleichen Untersuchung konnten klinische Anzeichen einer Infektion nur bei Tieren festgestellt werden, die älter als ein Jahr waren. Die Seroprävalenz bei sechs bis zwölf Monate alten Tieren lag unter 20%, bei über vier Jahre alten Tieren über 90% (Fernández-García *et al.* 2010).

In Europa war *B. besnoiti* lange Zeit endemisch in dem Gebiet der Pyrenäen in Frankreich und Spanien und im Süden Portugals (Besnoit und Robin 1912; Franko und Borges 1915; Cortes *et al.* 2005; Cortes *et al.* 2006c; EFSA-Statement 2010). In den letzten zehn Jahren erfolgte jedoch eine Ausbreitung in den Norden Frankreichs und nach Zentral- und Südspanien (Castillo *et al.* 2009; Fernandez-Garcia *et al.* 2009; EFSA-Statement 2010; Fernández-García *et al.* 2010; Jacquet *et al.* 2010). In Deutschland trat die bovine Besnoitiose zum ersten Mal im Jahre 2008 auf (Mehlhorn *et al.* 2009; Rostaher *et al.* 2010). Obwohl die Krankheit in Italien bei importierten Rindern bereits beschrieben war (Agosti *et al.* 1994; Mutinelli *et al.* 2011), wurden Fälle von boviner Besnoitiose bei Rindern beschrieben, die keinen Kontakt zu importierten Rindern hatte (Gentile *et al.* 2010; Gollnick *et al.* 2010a; Manuali *et al.* 2011; Gentile *et al.* 2012). Aufgrund der zunehmenden Ausbreitung in Europa wurde die bovine Besnoitiose von der European Food Safety Authority als „emerging disease“ in Europa eingestuft (EFSA-Statement 2010).

Außerhalb Europas gibt es Berichte über die bovine Besnoitiose aus diversen Ländern:

Afrikanische Länder in denen die Krankheit aufgetreten ist, sind Sudan (Hussein und Haroun 1975), Nigeria (Kumi-Diaka *et al.* 1981; Sannusi 1991), Republik Kongo (Pols 1960), Kenia (Njagi *et al.* 1998), Angola (Pols 1960), Südafrika (Pols 1960) Tschad, Kamerun, Uganda, Tansania, Namibia, und Botswana (Levine 1973; Olias *et al.* 2011).

In Asien findet sich die Krankheit in Israel (Goldman und Pipano 1983; Shkap *et al.* 1987a), Kasachstan und China (Levine 1973; Olias *et al.* 2011).

3.2 Übertragung

Da der Endwirt unbekannt ist, bleibt auch die Übertragung vom Endwirt auf den Zwischenwirt im Dunkeln. Aufgrund des signifikanten Zusammenhangs zwischen Prävalenz und dem Alter der infizierten Tiere wird von einer horizontalen Übertragung als Hauptübertragungsweg ausgegangen (EFSA-Statement 2010). Bei einem Ausbruch in Spanien wurde bei Tieren im Alter von 18 Monaten bis zu sechs Jahren die höchste Inzidenz der Krankheit beobachtet, wogegen sie bei unter sechs Monate alten Kälbern relativ selten auftrat (Fernández-García *et al.* 2010). Horizontale Übertragung geschieht wahrscheinlich hauptsächlich über direkten Kontakt von Tieren mit offenen Wunden, da *B. besnoiti*-Zysten in der Haut sehr oberflächlich lokalisiert sind (EFSA-Statement 2010; Fernández-García *et al.* 2010).

Experimentell konnte die Erkrankung von Rind auf Rind und Rind auf Kaninchen über Insekten übertragen werden. Stallfliegen (*Stomoxys calcitrans*), Tsetsefliegen (*Glossina brevipalpis*), Moskitos (*Culex simpsoni*) und Tabaniden können die Erkrankung mechanisch übertragen und eine Infektion auslösen (Bigalke 1968). Da Tachyzoiten auch in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden können, scheint es möglich, dass nicht-hämatophage Insekten wie *Musca domestica* und *M. autumnalis* die Krankheit mechanisch übertragen (Bigalke 1968; Cortes *et al.* 2003; Cortes *et al.* 2005).

Eine iatrogene Übertragung von Tachyzoiten beinhaltendem Blut und Zysten aus der Haut ist ebenfalls möglich (Pols 1960; Bigalke 1967, 1968).

Basson und Mitarbeiter infizierten Rinder intravenös mit *B. besnoiti* aus Zellkulturen, infektiösem Rinder- und Kaninchenblut sowie Hodengewebe von Kaninchen (Basson *et al.* 1970). Kaninchen lassen sich subkutan mit Bradyzoiten und Tachyzoiten sowie intraperitoneal mit Tachyzoiten aus Kaninchenblut infizieren (Basson *et al.* 1970; Basso *et al.* 2011).

Es gibt Hypothesen zu einer venerischen Übertragung von *B. besnoiti*, da Zysten auch in der Vagina von infizierten Tieren gefunden werden (Nobel *et al.* 1977). Andere Autoren schlagen vor, dass die Krankheit via Natursprung über chronisch infizierte Bullen innerhalb einer Herde verbreitet werden könnte (Castillo *et al.* 2009). Im Sperma verschiedener chronisch infizierter Bullen fanden sich keine Parasitenstadien (Kumi-Diaka *et al.* 1981). Sekoni und Mitarbeiter haben über einen längeren Zeitraum Sperma eines infizierten Bullen untersucht,

jedoch erwähnen sie nicht, ob Parasitenstadien im Sperma gefunden wurden oder nicht (Sekoni *et al.* 1992). Pols und Mitarbeiter untersuchten Sperma mehrerer chronisch infizierter Bullen, auch hier findet sich keine Erwähnung, ob Parasitenstadien im Sperma gesehen wurden oder nicht (Pols 1960). Eine mechanische Übertragung der Krankheit über den Deckakt wird diskutiert (Gollnick *et al.* 2010c).

Der Nachweis von Zysten in Endometrium und Vagina veranlasst Nobel und Mitarbeiter zu der Hypothese, dass eine vertikale plazentare Übertragung möglich sein könnte (Nobel *et al.* 1977). Diese These wurde jedoch bislang weder widerlegt noch bestätigt.

4 Risikofaktoren

4.1 Einfluss des Alters

Tiere, die jünger als sechs Monate sind, zeigen seltener Anzeichen einer Infektion oder Serokonversion als ältere Tiere (Bigalke 1981). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch bei einem Ausbruch in Zentralspanien hergestellt: Tiere zwischen sechs und zwölf Monaten zeigten keine klinischen Zeichen und ihre Seroprävalenz (<20%) lag im Vergleich zur Prävalenz aller untersuchten Tiere (90,8%) deutlich niedriger (Fernández-García *et al.* 2010).

Bei serologischen Untersuchungen von Bullen in Israel war der Anteil der seronegativen Tiere bei der Altersgruppe von unter einem Jahr deutlich höher. Dieser Effekt trat jedoch nicht bei den weiblichen Tieren auf (Goldman und Pipano 1983).

Bei südafrikanischen Rindern wurden Antikörper gegen *B. besnoiti* nur bei einzelnen Tieren unter zwölf Monaten nachgewiesen, Tiere älter als zwölf Monate zeigten höhere Antikörpertiter bei mehreren Tieren (Janitschke *et al.* 1984).

4.2 Einfluss des Geschlechts

Bei einem Ausbruch von boviner Besnoitiose in Spanien hatte das Geschlecht der Tiere keinen Einfluss auf die Ausbreitung der Erkrankung (Fernández-García *et al.* 2010). Der Anteil seropositiver Tiere bei einer serologischen Untersuchung in Israel war bei Bullen geringfügig

höher als bei weiblichen Tieren. Die Autoren stellten jedoch nicht fest, ob dieser Befund abhängig vom Geschlecht oder vom Alter war (Goldman und Pipano 1983).

Neuman berichtet von einem höheren Anteil seropositiver israelischer Bullen (Milch- und Fleischrassen) im Verhältnis zu den weiblichen Tieren. In Untersuchungen, die nach der Schlachtung durchgeführt wurden, konnte zusätzlich zu den Läsionen der Haut auch Läsionen in den Geweben des männlichen Genitaltraktes gefunden werden. In den Organen des weiblichen Geschlechtsapparates wurden hingegen keine Läsionen gefunden (Neuman 1972b).

Andere Autoren berichten von höherer Morbidität sowie Letalität und schwereren Krankheitsverläufen bei Bullen im Vergleich zu weiblichen Tieren (Schulz 1960; Legrand 2002).

4.3 Einfluss der Jahreszeit

Der überwiegende Teil neuer Fälle trat in Südafrika in den warmen und feuchten Monaten auf (Schulz 1960; Bigalke 1981). Bei einem Ausbruch in Spanien war das Auftreten klinischer Symptome mit den Sommermonaten assoziiert, als die Tiere gemeinsame Weideflächen nutzten (Fernández-García *et al.* 2010). Diese Befunde sind möglicherweise verursacht durch eine erhöhte Aktivität von hämatophagen Insekten in den warmen Monaten.

4.4 Einfluss der Rasse

Alle Rinderrassen scheinen für die bovine Besnoitiose empfänglich zu sein (Schulz 1960; EFSA-Statement 2010). Infektionen sind unter anderem beschrieben bei den Rassen Afrikaner (McCully *et al.* 1966), Baggara (Hussein und Haroun 1975), Blonde d'Aquitaine (Férrie 1984), Boran (Njagi *et al.* 1998), Charolais (Rostaher *et al.* 2010), Chianina (Gentile *et al.* 2010), Draughtmaster (Kumi-Diaka *et al.* 1981), Fleckvieh (McCully *et al.* 1966), Gascogne (Férrie 1984), Holstein Friesen (Goldman und Pipano 1983; Gentile *et al.* 2012), Hereford (Bigalke 1968), Jersey (Freudiger 2008), Limousin (Cortes *et al.* 2006a), Rahji (Kumi-Diaka *et al.* 1981), Salers (Freudiger 2008), White Fulani (Kumi-Diaka *et al.* 1981) sowie diverse Kreuzungen. Sowohl Milchrinderrassen als auch Fleischrinderrassen sind empfänglich (Neuman 1972b; Goldman und Pipano 1983; Jacquet *et al.* 2010).

Hinweise auf eine erhöhte Empfindlichkeit der Rassen Jersey, Prim Holstein und Salers finden sich in einer französischen Arbeit (Freudiger 2008).

4.5 Einfluss von Vektoren und Reservoirwirten

Es wurde gezeigt, dass die Erkrankung mechanisch über hämatophage Insekten übertragen werden kann. Jedoch ist die Zeitspanne der Infektiosität der Insekten nach der Aufnahme von Parasiten relativ kurz und liegt bei wenigen Stunden (Bigalke 1968). Eine Übertragung über *Musca* spp. erscheint auch möglich (Bigalke 1968; Cortes *et al.* 2003; Cortes *et al.* 2005). Ein Auftreten von entsprechenden Vektoren könnte demzufolge ein Risikofaktor darstellen (EFSA-Statement 2010). Ob wildlebende Reservoirwirte eine mögliche Rolle spielen, wird diskutiert (Kiehl *et al.* 2010; Basso *et al.* 2011).

5 Immunologie

5.1 Allgemeines

Immunsupprimierte (splenektomierte oder mit Glukokortikoiden behandelte) Rinder entwickeln schwere oder sogar tödliche Verläufe der bovinen Besnoitiose (Diesing *et al.* 1988). Bei immunsupprimierten Mäusen (GKO) verläuft eine Infektion mit *B. besnoiti* in den meisten Fällen letal (Schaes persönliche Mitteilung).

Mit *B. besnoiti* infizierte Rinder entwickeln eine Prämunität (*immunitas non sterilisans*), Zysten persistieren wahrscheinlich lebenslänglich und werden nicht eliminiert (Pols 1960; Euzéby 1987).

Eine belastbare protektive Immunität entsteht bei natürlich und experimentell infizierten Rindern sowie experimentell infizierten Kaninchen, eine Reaktion nach einer Challenge-Infektion wurde nicht beobachtet (Pols 1960; Bigalke *et al.* 1974a; Bigalke *et al.* 1974b). Gerbils (*Meriones tristrami*), die subkutan mit geringen Mengen an *B. besnoiti* Endozoiten aus der Zellkultur infiziert wurden, zeigten keine Reaktion auf eine Challenge-Infektion mit einer sonst letalen Parasiten-Dosis (Shkap und Pipano 1993).

Ein in Kaninchen und Zellkultur passagierter *B. besnoiti*-Stamm, der ursprünglich aus dem Streifengnu stammte, wurde zur Vakzination von Rindern verwendet. Mit diesem Vakzine-

Stamm infizierte Rinder zeigten nach Challenge-Infektion mit hohen Parasitendosen keine schweren Ausprägungsgrade der bovinen Besnoitiose und entwickelten nur wenige Zysten in der skleralen Konjunktiva. In Feldversuchen wurden nach „Vakzinierung“ keine klinischen Fälle beobachtet und die Inzidenz der subklinischen Fälle war deutlich geringer als in Kontrollherden (Bigalke *et al.* 1974a). Eine Lebend-Vakzine auf Basis eines attenuierten *B. besnoiti*-Stamms, produziert in Zellkultur, wird auch in Israel eingesetzt (Pipano 1997).

5.2 Angeborenes Immunsystem

Wachstum und Entwicklung von *Apicomplexa* in infizierten Wirten sowie die Ausprägung einer Resistenz gegen eine Infektion werden maßgeblich durch das Immunsystem beeinflusst. Untersuchungen zur Immunantwort auf eine Infektion mit apikomplexen Parasiten wurden hauptsächlich an Babesien, Eimerien, Plasmodien und *T. gondii* durchgeführt. Um eine Infektion zu bekämpfen sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem von Bedeutung (Frölich *et al.* 2012).

Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und die von ihnen produzierten Mediatoren sind wichtige Faktoren, um die Infektivität von apikomplexen Parasiten zu beeinflussen und das Ausmaß der Parasitämie zu reduzieren (Frölich *et al.* 2012). Insbesondere scheinen Interferon Gamma (IFN- γ), produziert von NK-Zellen, und Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF- α), Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), produziert von Makrophagen, eine wichtige Rolle bei der Entwicklungshemmung zu spielen (Frölich *et al.* 2012).

5.3 Erworbene Immunantwort: zelluläre Antwort

Nach natürlicher Infektion mit apikomplexen Parasiten ist die entstehende Immunität hauptsächlich zell-vermittelt (Frölich *et al.* 2012). Über die Immunreaktion nach einer Infektion mit *B. besnoiti* ist nicht viel bekannt, aber auch hier wird von einer hauptsächlich zell-vermittelten Immunität ausgegangen (Bigalke 1981; Euzéby 1987).

5.4 Erworbene Immunantwort: humorale Antwort

Erste Antikörper gegen *B. besnoiti* sind zwischen dem 15. und 18. Tag *post infectionem* im Serum nachweisbar, mit einem Titermaximum zwischen dem 30. und 40. Tag (Franc *et al.* 1987).

Maternale Antikörper werden über das Kolostrum an neugeborene Kälber übertragen inwieweit diese das Kalb vor einer Infektion schützen, ist nicht bekannt (Shkap *et al.* 1994).

Antikörper gegen *B. besnoiti* (detektiert mit IFAT und ELISA) scheinen bei experimentell infizierten Kaninchen keinen Schutz vor einer Infektion zu bieten (Kaggwa *et al.* 1979).

6 Pathogenese

Das Erkrankungsbild der bovinen Besnoitiose lässt sich in zwei Stadien unterteilen.

Nach der Infektion wird zunächst ein akutes Stadium (Anasarka-Stadium) beobachtet, in dem die Proliferation der Tachyzoiten in Endothelzellen, Makrophagen und noch nicht identifizierten Zellen stattfindet (Basson *et al.* 1970; Bigalke 1970). Auf dieses erste Stadium folgt ein chronisches Stadium (Skleroderma-Stadium), in dem die Proliferation der Bradyzoiten in mesenchymalen Zellen stattfindet. Obwohl es auch Autoren gibt, die das Krankheitsgeschehen der bovinen Besnoitiose in mehr als zwei Stadien einteilen, wird im weiteren Text von einem biphasischen Verlauf ausgegangen (siehe auch Abschnitt 8 Klinik, S. 38).

Es wird angenommen, dass sich die Pathogenese von *B. besnoiti* nach natürlicher Infektion ähnlich darstellt wie die Pathogenese nach artifizieller Infektion (Bigalke 1970).

Nach Inokulation (iatrogen oder über Insekten) findet die Vermehrung der Tachyzoiten in Endothelzellen und extravaskulären Makrophagen statt (Basson *et al.* 1970; Bigalke 1970). Die Dissemination der Parasiten erfolgt über frei im Blut befindliche Tachyzoiten oder über infizierte mononukleäre Zellen (Bigalke 1970).

Läsionen, die während des akuten Stadiums beobachtet werden können, sind von vaskulärer Natur: Die intraendotheliale Vermehrung der Tachyzoiten verursacht Vaskulitis, Perivaskulitis, Thrombosen, Hämorrhagien und Ödeme (Basson *et al.* 1970). Eine nähere

Beschreibung der Untersuchungen von Basson und Mitarbeiter findet sich bei „Pathologie der Haut“ (siehe Abschnitt 7.1.2.1 Veränderungen der Haut, S.32). Vaskulitis und Gefäßwandnekrosen erhöhen die Permeabilität der Gefäße und resultieren in der Ausbildung von Ödemen (Bigalke 1981). Möglicherweise spielt ein vom Parasiten produziertes Toxin bei der Entstehung der Läsionen eine unterstützende Rolle (Basson *et al.* 1970; Bigalke 1981; Euzéby 1987).

Proliferierende Organismen können bis zu drei Wochen p.i. nachgewiesen werden; im selben Zeitraum bleibt auch die Infektiosität des Blutes erhalten. Nach diesem Zeitabschnitt enden die extrazystische Proliferation der Parasiten und die Infektiosität des Blutes (Bigalke 1970).

Die Entwicklung der Zysten beginnt kurz vor Ende der extrazystischen Proliferation (Bigalke 1970). Bereits elf Tage p.i. können hypertrophierte intra- und extravaskuläre Zellen nachgewiesen werden, die von Parasiten befallen sind (Basson *et al.* 1970). Die Zystenentwicklung erstreckt sich über ca. zehn Wochen, die Wirtszellen hypertrophieren bis zu einer Größe von 390 µm und enthalten mehrere hypertrophierte Kerne. Wirtszellkerne und -zytoplasma werden von einer parasitophoren Vakuole, die zahlreiche Parasiten enthält, komprimiert (Basson *et al.* 1970; Bigalke 1970). Reife Zysten sind umgeben von einer äußeren dicken hyalinen Schicht und enthalten ungefähr 165 000 Parasiten (Bigalke 1970). Degenerierte Zysten können bereits 30 Tage p.i. beobachtet werden (Basson *et al.* 1970).

Die maximale Anzahl der Zysten wird wahrscheinlich in einer sehr kurzen Zeit gebildet, ausgehend von proliferierenden Parasiten während und direkt nach der Parasitämie. Diese These wird unterstützt durch die transiente Parasitämie und das Nichtvorhandensein zirkulierender Parasiten und unreifer Zysten in chronischen Fällen. Sobald die extrazystische Proliferation endet, werden wahrscheinlich keine neuen Zysten mehr gebildet (Bigalke 1968).

Die Wirtsreaktion auf *B. besnoiti*-Zysten ist unterschiedlich, sie kann von einer schwachen, bis zu einer hochgradigen Entzündung unter Beteiligung von Makrophagen, Epitheloidzellen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen und spindeligen Zellen reichen (Franko und Borges 1915; McCully *et al.* 1966).

Alopezie und Hautnekrosen entstehen durch hochgradige lokale Kreislaufstörungen im chronischen Stadium. Das Wachstum einer Vielzahl von Zysten im *Stratum papillare* der Haut mit begleitender granulomatöser Reaktion und Fibrose sowie Hyperkeratose und Akanthose

bedingen die typische klinische Symptomatik (Verdickung der Haut mit Faltenbildung) des Skleroderma-Stadiums (Basson *et al.* 1970; Bigalke 1981).

Die Letalität mit *B. besnoiti* infizierter Rinder ist niedrig. Tiere können sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium versterben. Die Angaben schwanken zwischen ein und zehn Prozent (Pols 1960; Fouquet 2009).

Für die bei Bullen beobachtete Degeneration und Atrophie der Hoden sowie Aspermatogenese gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze:

Die in Interstitium und subepithelial nachweisbaren Zysten können normale Zellen verdrängen oder ersetzen und so mit der Spermatogenese interferieren. Zysten, die sich in den Gefäßen des Samenstrangs befinden, können die Blutversorgung des Hodens negativ beeinflussen. Thrombosierungen von Arterien und Venen können durch ins Lumen ragende Zysten ausgelöst werden und degenerative Prozesse des Hodens und Nebenhodens einleiten. Eine Hyperthermie des Hodens aufgrund eines schlechten Wärmeaustauschs durch das verdickte hyperkeratotische Skrotum könnte eine weitere Erklärung für die Degeneration des Hodens und Nebenhodens liefern (Neuman 1972a; Kumi-Diaka *et al.* 1981; Sekoni *et al.* 1992). Ähnliche Erklärungsansätze werden auch von anderen Autoren vorgeschlagen, die sich mit chronischer Besnoitiose bei Ziegen beschäftigen (Cheema und Toofanian 1979).

7 Pathologie

7.1 Pathologie bei Rindern

7.1.1 Rinder: Akutes Stadium

Im akuten Stadium der bovinen Besnoitiose werden Läsionen in der Haut und Schleimhaut, den Lymphknoten, der Muskulatur sowie einigen inneren Organen gefunden (Basson *et al.* 1970; Jacquiet *et al.* 2010).

Basson und Mitarbeiter untersuchten neun experimentell intravenös mit bis zu $1,07 \times 10^9$ Tachyzoiten von *B. besnoiti* infizierte Rinder, von denen zwei akut verendeten:

Die Haut zeigte generalisiertes Ödem mit begleitender subkutaner Stauung, disseminierte hämorrhagische Herde und subkutane Thrombosen. Stauung, Petechien und Ekchymosen in der Haut waren insbesondere an den Extremitäten ausgeprägt. An den Schleimhäuten der Nase traten pseudomembranöse Auflagerungen mit disseminierten Petechien auf. Stauung, Ödem und hämorrhagische Herde konnten auch in Hämal- und peripheren Lymphknoten gefunden werden. Diverse Muskeln waren degeneriert oder nekrotisch. Das Tier, das am stärksten betroffen war, zeigte zusätzlich eine ausgeprägte serofibrinöse Arthritis der Fesselgelenke mit begleitender serofibrinöser Tendovaginitis und vielen Petechien und Ekchymosen in den Nerven der Vordergliedmaßen. Die Milz war geringgradig vergrößert und die Lebern beider Tiere waren gefleckt mit Stauung der Galle und Petechien in der Gallenblase. Petechiale Blutungen wurden in Lunge, Trachea, Larynx und Pharynx gefunden sowie bei einem Tier im linken Ventrikel, Nieren, Hypophyse, Labmagen und Schleimhaut des Uterus. Lunge und Trachea zeigten zudem Stauung und Ödem (Basson *et al.* 1970).

Histologisch zeigten die Wände vieler Venen in der Unterhaut, am Kopf und an den Gliedmaßen kleine hämorrhagische Herde, die Intima war bedeckt von einem grau-rötlichen Material, und viele Venen waren thrombosiert (Basson *et al.* 1970).

An den überlebenden Rindern studierten die bereits genannten Autoren den histologischen Verlauf des akuten Stadiums bis zum chronischen Stadium in der Haut:

An Tag 3 p.i. konnten Stauung, wenige kleine Hämorrhagien, Leukostase und geringgradige Perivaskulitis nachgewiesen werden. Eine geringe Anzahl von eosinophilen Granulozyten und mononukleären Zellen war vorhanden.

An Tag 4 und 5 p.i. war die eosinophil-granulozytäre Reaktion in einem Fall weiter fortgeschritten und eine geringgradige Vaskulitis lag vor.

Am Tag 6 konnten *B. besnoiti*-Stadien intraendothelial in einer Vene nachgewiesen werden.

An Tag 7 konnten in zwei Fällen *B. besnoiti*-Organismen außerhalb von Gefäßen gefunden werden. Gruppen von drei bis fünf Parasiten wurden intravakuolär in Endothelzellen gefunden. Zudem wurden ausgeprägtes Ödem sowie beginnende Thrombosen kleiner Gefäße festgestellt.

An Tag 8 wurden proliferierende Organismen in Endothelzellen und außerhalb von Blutgefäßen gesehen, begleitet von Hämorrhagien, perivaskulären Zellproliferationen (Makrophagen) und fortschreitender Thrombose kleiner Gefäße.

An Tag 9 konnten zahlreiche intra- und extrazelluläre Organismen und eine ausgeprägte Thrombose kleiner Venen festgestellt werden.

An Tag 10 wurden *B. besnoiti*-Organismen extravaskulär in mononukleären Zellen nachgewiesen sowie zahlreiche Thromben mit darauffolgender Gewebsnekrose und vermehrt perivaskuläre Zellen (Basson *et al.* 1970).

Die Hauptläsionen im akuten Stadium sind vaskulärer Natur (siehe auch **Tabelle II-1**). In den Untersuchungen von Basson und Mitarbeiter zeigten viele kleine und große Venen Hämorrhagien und fibrinoide Nekrosen der Gefäßwand sowie intraluminale Thromben. Parasiten wurden immer in Vakuolen gefunden, Gefäßendothelzellen und primitive mesenchymale Zellen der Intima waren befallen. Vaskulitis, Perivaskulitis und hochgradiges Ödem waren die Hauptmerkmale der Veränderungen (Basson *et al.* 1970).

Tabelle II-1: Histologische Veränderungen im akuten Stadium der bovinen Besnoitiose.

Organ(system)	Gewebe/ Lokalisationen	Veränderungen	Autoren
Haut	Venulen bis größere Venen	Hämorrhagie, fibrinoide Gefäßwandnekrose, Thrombosierung, Peri-/Vaskulitis, intraendotheliale Parasiten	Basson <i>et al.</i> (1970)
	Interstitium	Hämorrhagie, hochgradiges Ödem	
	Epidermis	Nekrosen, Haarfollikelnekrose/ -degeneration	
Bewegungsapparat	Skelettmuskulatur	Zenkersche Degeneration, Mikrokavitation, Lyse, Mineralisation	
Auge	Iris	Hämorrhagische Foci	

Organ(system)	Gewebe/ Lokalisationen	Veränderungen	Autoren
Respirationstrakt	Nasale Mukosa, Larynx, Trachea	Hämorrhagie, Ödem, Nekrose, Pseudomembranen, Erosion	Basson <i>et al.</i> (1970)
	Lunge	proliferierende Parasiten, geringgradige Pneumonie, Stauung, Ödem, Emphysem	
Digestionstrakt	Leber	trübe Schwellung, vakuoläre Veränderungen, hyalintropfige Degeneration, Nekrose, Parasiten	
Harnapparat	Niere	vakuoläre Degeneration, fokale geringgradige interstitielle rundzellige Infiltrate	
Lymphsystem	Lymphknoten	Hyperplasie, Stauung, Hämorrhagie, fibrinoide Nekrose, Aktivierung und Proliferation der Zellen des Retikuloendothelialen Systems, hypertrophe und mehrkernige Riesenzellen in den Sinus und Marksträngen	
	Hämallymphknoten	ausgedehnte Nekrose, Hämorrhagie, Parasiten	

7.1.2 Rinder: Chronisches Stadium

Im chronischen Stadium der bovinen Besnoitiose werden makroskopisch erkennbare Veränderungen an der Haut, der skleralen Konjunktiva, den Faszien, den Gefäßen, den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes und den Organen des Geschlechtsapparats gefunden (McCully *et al.* 1966; Levine 1973; Kumi-Diaka *et al.* 1981; Nobel *et al.* 1981; Majzoub *et al.* 2010).

Histologisch lassen sich Zysten in diversen Geweben nachweisen (siehe **Tabelle II-2**).

Tabelle II-2: Gewebe, in denen beim Rind *B. besnoiti*-Zysten gefunden werden können.

Organ(system)	Gewebe/Lokalisation	Verfahren	Autoren
Haut	diverse Lokalisationen	histologisch	diverse
	Skrotum	histologisch	Kumi-Diaka <i>et al.</i> (1981); Sekoni <i>et al.</i> (1992); Gentile <i>et al.</i> (2010)
	Augenlider, Hals, Brust, Lenden, Gliedmaßen, Flotzmaul, Schwanz, Zitzen	histologisch	Majzoub <i>et al.</i> (2010)
	Subkutis	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
Bewegungsapparat	Skelettmuskulatur	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Faszien	makroskopisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Sehnen	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Majzoub <i>et al.</i> (2010)
	Sehnenscheiden	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Gelenke	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Majzoub <i>et al.</i> (2010)
	Periost	histologisch, makroskopisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
Auge	sklerale Konjunktiva	makroskopisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Bigalke (1968); Gentile <i>et al.</i> (2012)
	Sklera	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Kornea (vaskularisiert)	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Kornea	histologisch	Gentile <i>et al.</i> (2012)
	Ziliarkörper	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)

Organ(system)	Gewebe/Lokalisation	Verfahren	Autoren
Auge	Iris	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Gentile <i>et al.</i> (2012)
Respirationstrakt	Nasenseptum	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Majzoub <i>et al.</i> (2010)
	Nasale Mukosa	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Sinus	makroskopisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Konchen	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Gentile <i>et al.</i> (2010); Majzoub <i>et al.</i> (2010); Gentile <i>et al.</i> (2012)
	Pharynx	makroskopisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Larynx (+ <i>Perichondrium</i>)	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966); Gentile <i>et al.</i> (2010); Gentile <i>et al.</i> (2012)
	Trachea	makroskopisch, histologisch	Pols (1960); McCully <i>et al.</i> (1966); Gentile <i>et al.</i> (2010); Gentile <i>et al.</i> (2012)
	Bronchien	makroskopisch	Pols (1960); McCully <i>et al.</i> (1966)
	Lunge	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
Digestionstrakt	Pharynx	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Zungenmuskulatur	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Leber	keine Angabe	Jacquet <i>et al.</i> (2010)
Weiblicher Geschlechtsapparat	<i>Vestibulum vaginae</i>	histologisch	Majzoub <i>et al.</i> (2010)
	Vagina	histologisch	Nobel <i>et al.</i> (1981)
	Zervix	histologisch	Nobel <i>et al.</i> (1981)
	<i>Corpus et Cornua uteri</i>	histologisch	Nobel <i>et al.</i> (1981)

Organ(system)	Gewebe/Lokalisation	Verfahren	Autoren
Männlicher Geschlechtsapparat	Penis (<i>Lamina propria</i>)	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	<i>Tunica dartos</i> , <i>T. vaginalis</i> , <i>T. albuginea</i>	histologisch	Kumi-Diaka <i>et al.</i> (1981)
	Hoden	histologisch	Basson <i>et al.</i> (1970); Kumi-Diaka <i>et al.</i> (1981); Sekoni <i>et al.</i> (1992)
	Nebenhoden	histologisch	Kumi-Diaka <i>et al.</i> (1981)
Lymphsystem	Tonsillen	histologisch	Majzoub <i>et al.</i> (2010)
	Lymphknoten	histologisch, keine Angabe	McCully <i>et al.</i> (1966); Basson <i>et al.</i> (1970)
	Lymphgefäße	histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Milz	keine Angabe	Pols (1960)
Kardiovaskuläres System	Endokard	makroskopisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	Herzmuskulatur	keine Angabe	Jacquet <i>et al.</i> (2010)
	kleine Arterien (<i>Tunica intima</i> , <i>T. media</i> und <i>T. adventitia</i>)	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
	kleine und größere Venen (<i>Tunica intima</i> , <i>T. media</i> und <i>T. adventitia</i> , Klappen)	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)
Nervensystem	peripherer Nerv (<i>Perineurium</i>)	makroskopisch, histologisch	McCully <i>et al.</i> (1966)

7.1.2.1 Veränderungen der Haut

Makroskopisch erscheint die Haut verdickt und faltig. Häufige Befunde sind Hypotrichose, Alopezie, bis zu hochgradige Lichenifikation, Seborrhoe, Erytheme und Hyperkeratose (McCully *et al.* 1966; Majzoub *et al.* 2010; Rostaher *et al.* 2010). Histologisch können zahlreiche Zysten im *Stratum papillare*, *Stratum reticulare* und der Subkutis gefunden

werden. Zysten liegen reaktionslos im Gewebe oder sind umgeben von einer dicken Schicht kollagener Fasern und eventuell einer zellulären Infiltration unter Beteiligung von Makrophagen, Epitheloidzellen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten und spindeligen Zellen (McCully *et al.* 1966; Basson *et al.* 1970; Majzoub *et al.* 2010).

Konglomerate von Zysten mit konfluierenden hyalinen Schichten können beobachtet werden (Basson *et al.* 1970).

Die Entstehung der Zysten in der Haut experimentell mit *B. besnoiti* intravenös infizierter Rinder läuft wie folgt ab (Basson *et al.* 1970):

An Tag 11-13 p.i. wurden bei zwei Tieren intra- und extravaskuläre hypertrophe Zellen gesehen, die ein oder mehrere Organismen enthielten und sehr junge Zysten darstellten (Größe: 22 µm). Das Zytoplasma dieser Zellen war rot-bläulich und mukoid.

An Tag 16 p.i. wurden in zwei Fällen die hypertrophen Zellen multinukleär (2-4 Kerne) und enthielten kleine Kolonien von Organismen (Größe: 45 µm). Eine Manschette aus violett-bläulichem Material in den jungen Zysten stellte die sich entwickelnde Zystenwand dar.

An Tag 19 und 20 p.i. waren viele junge Zysten nachweisbar (Größe: 48 bis 67 µm) mit einer erhöhten Anzahl von Kernen und Parasiten.

An Tag 22 bis 27 p.i. wurden die Zysten größer und zeigten weitere Kerne (bis zu 14).

An Tag 28 und 29 p.i. konnte in immaturren Zysten mitotische Figuren der Wirtszellkerne gesehen werden (Größe der Zysten: 108 bis 135 µm)

An Tag 30 und 33 p.i. konnten septierte Zysten mit zwei bis vier Kompartimenten beobachtet werden sowie eine kleine Anzahl von zerfallenden Zysten mit pyknotischen Kernen und intensiver Eosinophilie von Wirtszellzytoplasma und Parasiten.

An Tag 42 und 43 wurde eine weitere nekrotische Zyste gesehen, unreife Zysten waren bis zu 240 µm groß.

An Tag 71 wurden granulomatöse Reaktionen um degenerierende und intakte reife Zysten beobachtet.

Die größten Zysten (Tag 108) hatten einen Durchmesser von 390 µm.

7.1.2.2 Veränderungen der skleralen Konjunktiva und Faszien

B. besnoiti-Zysten können in der skleralen Konjunktiva und in Faszien mit bloßem Auge entdeckt werden, häufig wird der Nachweis von *B. besnoiti*-Zysten in der skleralen Konjunktiva als diagnostisches Kriterium verwendet (McCully *et al.* 1966; Bigalke 1968; Nobel *et al.* 1981; Rostaher *et al.* 2010).

7.1.2.3 Veränderungen des Gefäßsystems

Veränderungen sind vor allem in den Venen, insbesondere an den distalen Gliedmaßen zu finden. Betroffen sind vor allem kleine und mittelgroße Venen, aber auch kleine Arterien. Makroskopisch stellen sich die Zysten als weiße rundliche Herde dar, die in das Gefäßlumen hineinragen, sehr stark befallene Gefäße besitzen eine granuliert wirkende Intima. Eine durch die Zysten bedingte Verdickung der Gefäßwand mit begleitender Phlebitis kann beobachtet werden. Zysten konzentrieren sich an Umschlagpunkten, Klappen und Bereichen, in denen mehrere tributäre Venen zusammenfließen.

Histologisch können frei im Lumen von Venen und Arterien befindliche *B. besnoiti*-Stadien nachgewiesen werden, die manchmal agglutiniert in Gruppen auftreten. Zysten können in der *Tunica intima*, *media* und *adventitia* auftreten. Manche liegen direkt unter dem Endothel und ragen in das Gefäßlumen hinein, andere verursachen keine Vorwölbung des Endothels und erstrecken sich in die darunter liegende *T. media*. In einigen Fällen kann das Endothel hyperplastisch sein, entsprechende Gefäßwandschichten in der Zystenumgebung können sklerosieren (McCully *et al.* 1966).

7.1.2.4 Veränderungen der Schleimhäute des Respirationstrakts

Zahlreiche makroskopisch erkennbare Zysten können in der Schleimhaut von Nasenseptum, Konchen, Sinus, Larynx, Trachea, Bronchien und Lunge gefunden werden (McCully *et al.* 1966; Gentile *et al.* 2010; Majzoub *et al.* 2010; Gentile *et al.* 2012).

Histologisch ragen diese, nur noch von einer dünnen Epithelschicht bedeckt, in das Lumen hinein oder befinden sich in der *Lamina propria*. Meistens sind sie von einer gering- bis hochgradigen entzündlichen Zellinfiltration umgeben unter Beteiligung von Epitheloidzellen, mehrkernigen Riesenzellen, kleinen runden Zellen, spindeligen Zellen, eosinophilen Granulozyten und Plasmazellen (McCully *et al.* 1966; Majzoub *et al.* 2010).

In einigen Fällen bilden Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen einen inneren Ring um eine Zyste, der von einem äußeren Ring aus kleinen runden und spindeligen Zellen umgeben wird. In anderen Fällen gibt es eine zentral befindliche Akkumulation aus eosinophilen Granulozyten, die von Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen umgeben sind. Die entzündliche Reaktion um die Zysten kann in hochgradigen Fällen eine diffuse Rhinitis vortäuschen (McCully *et al.* 1966). Manche der Zysten liegen reaktionslos im Gewebe. Die granulomatöse Reaktion ist ausgeprägter in der Umgebung von toten Zysten, die manchmal auch kalzifiziert sein können (McCully *et al.* 1966).

Histologisch nachweisbare Zysten in Larynx und Trachea rufen keine oder nur eine geringgradige Wirtsreaktion hervor. Kleine, degenerierte Zysten, manchmal umgeben von einer granulomatösen entzündlichen Reaktion, können auch in den Alveolarsepten nachgewiesen werden (McCully *et al.* 1966).

7.1.2.5 Veränderungen der Organe des Geschlechtsapparats

Das Skrotum zeigt dieselben Veränderungen, die auch schon bei der Haut beschrieben sind: Alopezie, Verdickung und Krusten. Makroskopisch können kleine Knötchen in *Tunica vaginalis* und *albuginea*, Hoden und Nebenhoden nachgewiesen werden. Manche Hoden sind „gangränös“, von brauner Farbe und weicher Konsistenz (Kumi-Diaka *et al.* 1981).

Histologisch können Zysten mit begleitender Entzündung in diversen Lokalisationen (siehe **Tabelle II-2**, S. 30) nachgewiesen werden sowie Degeneration und Ersatz der testikulären Keimzellen und partielles oder komplettes Aussetzen der Spermatogenese (Kumi-Diaka *et al.* 1981; Sekoni *et al.* 1992; Cortes *et al.* 2006c).

In der Untersuchung von Kumi-Diaka und Mitarbeitern waren Skrotum und Inhalt hauptsächlich betroffen, die Samenleiter am wenigsten. In den Urethrae, Samenblasendrüssen, Harnröhrenzweibeldrüsen und Prostatae konnten keine Zysten nachgewiesen werden (Kumi-Diaka *et al.* 1981; Sekoni *et al.* 1992).

In einem Fall wurden hochgradige testikuläre Läsionen gefunden: ausgedehnte Nekrosen der *Tubuli seminiferi* mit dystrophischer Verkalkung und Aussetzen der Spermatogenese in den anliegenden *Tubuli* sowie geringgradige interstitielle lymphozytäre Infiltration in der Umgebung von Nekrosen und Zysten (Basson *et al.* 1970).

Fibrotische und verkleinerte Hoden mit testikulären Nekrosen konnten auch bei einem Bullen in Portugal festgestellt werden (Cortes *et al.* 2005).

Im weiblichen Geschlechtsapparat können Zysten in diversen Lokalisationen nachgewiesen werden (siehe **Tabelle II-2**, S. 30), in manchen Fällen reaktionslos, in anderen mit bis zu hochgradiger granulomatöser Entzündung mit Nachweis von mehrkernigen Riesenzellen (Nobel *et al.* 1981). Die Fruchtbarkeit weiblicher Rinder scheint durch eine Infektion mit *B. besnoiti* nicht beeinträchtigt zu werden (Shkap *et al.* 1994).

7.2 Pathologie bei Versuchstieren

Experimentell infizierte **Kaninchen** entwickelten Fieber (über drei bis sieben Tage), schmerzhafte subkutane Ödeme an Kopf, Ohren, Gliedmaßen und Genitalien (über drei bis 14 Tage), Aszites, Petechien in Lymphknoten, Haut, Lungen und Herz, fibrinöse und hämorrhagische Entzündungen und Nekrosen der Hoden, Thrombosierung von Gefäßen und Lebernekrosen (Pols 1960; Basson *et al.* 1970).

Neben dem Nachweis von intraendothelial gelegenen Parasitenstadien, von sechs bis acht Stadien pro Zelle, dominierten histologisch vaskuläre Läsionen: In der Haut konnten Ödeme, Hämorrhagien, nekrotische und fibrinoide Vaskulitiden und Hautnekrosen festgestellt werden. Nekrotisierende Vaskulitis und Thrombosen der Gefäßen sowie Nekrosen des Parenchyms wurden auch in Hoden und Nebenhoden nachgewiesen. In der Leber wurden Herde von degenerierten und nekrotischen Leberzellen sowie eine interstitielle Hepatitis nachgewiesen. Die Lungen zeigten Gefäßthrombosierungen und fokale geringgradige und interstitielle Lungenentzündungen. Weibliche tragende Tiere können abortieren (Basson *et al.* 1970; Neuman und Nobel 1981).

Experimentell infizierte **weiße Mäuse**, die mit Bauchhöhlenflüssigkeit infizierter Gerbils (*Meriones tristrami*) inokuliert wurden, zeigten keine klinische Symptomatik. Histologische Läsionen variierten von gering- bis hochgradig: In Leber und Niere konnte eine fettige Degeneration der parenchymatösen Zellen, geringgradige mononukleäre Zellinfiltration und proliferierende Parasiten nachgewiesen werden. Im Gehirn waren in der Anfangsphase von sechs bis zehn Tagen geringgradiges Ödem und subependymale Infiltration mit mononukleären Zellen nachzuweisen. Einen Monat später konnten Meningitis, Chorioidplexitis und perivaskuläres Cuffing beobachtet werden. Nach sechs Monaten war

eine chronische Meningitis sowie mehrere nekrotische Herde mit umgebender granulomatöser Entzündung und dystrophischer Verkalkung ausgebildet (Neuman 1965).

Experimentell infizierte intakte und splenektomierte **Gerbils** (i.p. inokuliert mit infektiösem Kaninchenblut oder infektiöser Bauchhöhlenflüssigkeit anderer Gerbils) zeigten Anorexie, Bewegungsstörungen und Krämpfe und eine Letalität von 60-70%. In der Bauchhöhle fanden sich fibrinöse Auflagerungen auf den Organen und vermehrtes Exsudat, das reich an Parasitenstadien war. Die am häufigsten betroffenen Organe waren Gehirn, Leber, Lunge und Milz. Im Gehirn wurden periependymale und meningeale Infiltrate gefunden. Die Leber zeigte zentrolobuläre fettige Degeneration sowie Parasitenstadien im Bereich der portalen Räume mit begleitender mononukleärer und histiozytärer Infiltration. Läsionen der Lunge waren charakterisiert durch noduläre subpleurale mononukleäre Infiltrationen, Verdickung der alveolären Septen, kompensatorisches Emphysem und Nachweis zahlreicher Parasiten. Das Retikuloendotheliale System in der Milz war hyperplastisch. Herz und Nieren zeigten keine Veränderungen (Neuman 1962).

Hamster, i.p. mit Zystozoiten inokuliert, zeigten Keratokonjunktivitis, Paraplegie, Paralyse, Kreislaufen und starben letztendlich. Histologisch zeigten die Tiere interstitielle polymorphzellige Myokarditis, fettige Degeneration von Hepatozyten und lymphozytäre Infiltration der Portalräume sowie Ödematisierung von Meningen und Ependym, subependymale Gliose und geringgradige Perivaskulitis (Neuman und Nobel 1981). Die zentralnervöse Symptomatik trat bei den Untersuchungen anderer Autoren nicht auf (Shkap *et al.* 1987a).

Meerschweinchen, i.p. mit infektiöser Bauchhöhlenflüssigkeit von Gerbils (*Meriones tristrami*) infiziert, zeigten akut einsetzende Anorexie, Krämpfe, Paralysen und verstarben einen Tag nach Auftreten der klinischen Symptomatik. Histologisch wurden fettige Degeneration und polymorphzellige Infiltration in der Leber, Myokarditis sowie Gliose und perivaskuläre mononukleäre Infiltrate im Gehirn nachgewiesen (Neuman und Nobel 1981). Die zentralnervöse Symptomatik trat bei den Untersuchungen anderer Autoren nicht auf (Shkap *et al.* 1987a).

In experimentell i.p. infizierten **GKO-Mäusen** konnten Parasiten histologisch intra- und extrazellulär in Lunge, Leber und Milz, mittels PCR in Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Milz und Niere nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Parasiten

zytologisch intra- und extrazellulär in der Bauchhöhlenflüssigkeit und in Monozyten und neutrophilen Granulozyten in Blutaussstrichen gefunden werden. Histologisch zeigten Leber multifokale Nekrosen und gemischtzellige Infiltrationen, die Lunge eine rote Hepatisation und das Gehirn perivaskuläres Cuffing (Schaes *et al.* 2009; Basso *et al.* 2011).

8 Klinik

Die Inkubationszeit beträgt bei Rindern zwischen einem und 13 Tagen, abhängig von der Art der Infektion (Basson *et al.* 1970). Rinder, die mit Methoden infiziert wurden, die auch in der Natur vorkommen, haben eine durchschnittliche Inkubationszeit von 13 Tagen (Bigalke 1968).

Klinisch kann die Erkrankung in ein akutes und ein chronisches Stadium eingeteilt werden.

Nur zur Vollständigkeit sei erwähnt, dass einzelne Autoren die Erkrankung in drei klinische Phasen unterteilen: Eine akute Fieberphase, in der die Tiere Photophobie, vermehrten Nasen- und Augenausfluss, Anorexie und erhöhte Herz- und Atemfrequenzen zeigen. Eine zweite Phase, in der Schwellungen der Lymphknoten, geringgradig erhöhte Temperatur und Ödeme auftreten. Und eine chronische Phase, in der Zystenbildung und Verdickung der Haut zu beobachten sind (Jacquiet *et al.* 2010). Im weiteren Text wird jedoch von einem biphasischen Verlauf ausgegangen.

Bigalke beschreibt den Beginn des **akuten Stadiums** als den Zeitpunkt, an dem Fieber als erstes klinisches Symptom auftritt. Der Übergang zwischen akutem und chronischem Stadium kann klar erkennbar sein durch Abklingen von Ödemen und Fieber. Jedoch kann es auch zu einem fließenden Übergang beider Stadien kommen (Bigalke 1981).

Im akuten Stadium zeigen infizierte Tiere Fieber, Schwäche, Erhöhung der Herz- und Atemfrequenzen, Nasen- und Augenausfluss, Photophobie, steifen Gang oder Lahmheit, Anorexie und Gewichtsverlust, Aussetzen der Pansentätigkeit und Schwellungen der oberflächlichen Lymphknoten (siehe auch **Tabelle II-3**, S. 40). Insbesondere an Kopf und den distalen Gliedmaßen kommt es zu ödematösen Verdickungen der Haut (*Anasarka*) (Pols 1960; Bigalke 1981; Cortes *et al.* 2005; Jacquiet *et al.* 2010). Infizierte Bullen können akute, schmerzhaftes Orchitiden entwickeln und anschließend transient oder permanent infertil

werden. Trächtige Tiere können abortieren (Soulsby 1968; Cortes *et al.* 2005; Jacquiet *et al.* 2010). Neuman und Nobel konnten jedoch bei einer Feldstudie (800 Kühe aus einem endemischen Gebiet) keine sichtbaren negativen Effekte der Krankheit auf die Trächtigkeit nachweisen (Neuman und Nobel 1981). Allerdings zeigen nur wenige infizierte Tiere die Symptomatik des akuten Stadiums (Pols 1960; Jacquiet *et al.* 2010).

Im **chronischen Stadium** zeigen hochgradig infizierte Tiere Verdickungen und Verhärtungen der Haut, mit verminderter Elastizität und Faltenbildung. Des Weiteren zeigen sie teilweise ausgeprägte Gewichtsverluste trotz erhaltenen Appetits, Lymphknotenvergrößerungen, Lichenifikation, Hyperpigmentation und Hyperkeratose der Haut, Alopezie sowie makroskopisch sichtbare Zysten in der skleralen Konjunktiva und Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* (Pols 1960; Bigalke 1968, 1981; Cortes *et al.* 2005; Jacquiet *et al.* 2010; Rostaher *et al.* 2010). Chronisch infizierte Bullen vollständig steril sein, die Hoden können atrophieren und sich verhärten (Pols 1960; Bigalke 1981; Kumi-Diaka *et al.* 1981). Bei einem chronisch mit *B. besnoiti* infizierten Bullen ist der Verlust der Libido beschrieben (Sekoni *et al.* 1992).

Ein großer Teil der infizierten Tiere ist klinisch unauffällig, kann aber durch Nachweis von Antikörpern im Serum identifiziert werden (Fernández-García *et al.* 2010). Bis zu 70% der Tiere einer Herde können klinisch unauffällig sein (Gollnick *et al.* 2010b).

Tabelle II-3: Abfolge der klinischen Symptome nach experimenteller Infektion mit *B. besnoiti* (nach Basson et al. 1970 und Bigalke 1981).

Stadium	Abfolge der Symptome	Erstmaliges Auftreten der Symptome in Tagen <i>post infectionem</i>
Anasarka	Fieber	1-5
	Inappetenz	3
	Polypnoe	3
	Hyperämie des Flotzmauls	4
	Endozoiten im Blutaussstrich nachweisbar	4
	Tachyzoiten in Endothelzellen (histologisch)	6
	Ödeme	7
	Zysten (histologisch)	11
	Endozoiten nicht mehr im Blutaussstrich nachweisbar	12
	Normale Temperatur	14
	Hautnekrosen	21
	Ödeme verschwinden	23
	Alopezie	25
	Sklerodermie	25-35
Sklero-derma	Zysten in der skleralen Konjunktiva	36
	Reife Zysten (histologisch)	71

9 Diagnostik und Differentialdiagnosen

9.1 Klinische Diagnostik

Im akuten Stadium ist eine eindeutige klinische Diagnose schwer zu stellen, da die Symptomatik relativ unspezifisch ist und leicht Verwechslungen mit anderen Infektionskrankheiten wie beispielsweise mit dem Bösartigen Katarrhalfieber (BKF) oder der Blauzungkrankheit auftreten können (Jacquiet *et al.* 2010).

Im chronischen Stadium sind differentialdiagnostisch an BKF und Blauzungenkrankheit sowie an Sarkoptesräude, Dermatomykose, thermische Verbrennungen, Allergie, Photosensibilität, kutanes Malignes Lymphom, X-Disease Hyperkeratose und Dermatophilose zu denken (Rostaher *et al.* 2010).

Eine klinische Verdachtsdiagnose im chronischen Stadium kann durch Nachweis von Zysten in der skleralen Konjunktiva, im *Vestibulum vaginae* und durch die typischen Veränderungen der Haut gestellt werden.

9.2 Serologische Diagnostik

Der serologische Nachweis von Antikörpern gegen *B. besnoiti* ist von besonderer Bedeutung, da dies die einzige verlässliche Methode ist, infizierte Rinder ohne makroskopisch und histologisch nachweisbare Gewebezysten zu identifizieren. Da chronisch infizierte Tiere eine bedeutsame Rolle beim Einschleppen der Krankheit in eine naive Herde zu spielen scheinen (Bigalke 1968), ist die Identifikation dieser Tiere wichtig, um eine Ausbreitung der Krankheit in noch nicht befallene Herden zu verhindern.

Für den Nachweis von Antikörpern gegen *B. besnoiti* in den Seren infizierter Rinder sind mehrere Nachweisverfahren publiziert: Immunofluorescent Antibody Tests (IFAT), Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) und Immunoblots (Westernblots) (Janitschke *et al.* 1984; Shkap *et al.* 1984; Cortes *et al.* 2006b; Fernández-García *et al.* 2009; Fernández-García *et al.* 2010; Schares *et al.* 2010; Schares *et al.* 2011a). Es stehen aber auch kommerziell erhältliche ELISAs zur Verfügung (Liénard *et al.* 2011; Schares *et al.* 2011a).

9.2.1 IFAT

Im IFAT werden verschiedene Tachyzoiten-Isolate aus Israel (Shkap *et al.* 2002; Cortes *et al.* 2006b; Cortes *et al.* 2006c), Spanien (Fernández-García *et al.* 2009; Fernandez-Garcia *et al.* 2009) und Portugal (Scharas *et al.* 2010; Schares *et al.* 2011a) verwendet. Tachyzoiten-Stadien dieser Isolate zur Herstellung der IFAT-Objektträger wurden aus Vero- und MARC-145-Zellkultur gewonnen. Janitschke und Mitarbeiter verwendeten ein südafrikanisches Zellkultur-Isolat aus dem Streifengnu (Janitschke *et al.* 1984).

Bei einem Cut-off Titer von ≥ 200 besaß der IFAT eine Sensitivität von 91,9% und eine Spezifität von 100% (Schares *et al.* 2010). Kreuzreaktionen mit *N. caninum* wurden beobachtet bei einem Cut-off Titer von < 200 (Shkap *et al.* 2002; Schares *et al.* 2010).

9.2.2 ELISA

Mehrere indirekte in-house ELISAs stehen zur Verfügung, auch hier werden zur Herstellung der Antigen-Extrakte Tachyzoiten aus der Zellkultur verwendet (Janitschke *et al.* 1984; Shkap *et al.* 1984; Cortes *et al.* 2006b; Fernández-García *et al.* 2010). Die Angaben zur Sensitivität dieser in-house Tests reichen von 87% bis 100%. Die Spezifität wurde mit 96,4% beziehungsweise 100% angegeben (Cortes *et al.* 2006b; Fernández-García *et al.* 2010).

Auf dem Markt sind auch kommerziell erhältliche indirekte ELISAs, von denen einer in Deutschland zugelassen ist (Schares *et al.* 2011a). Vom Hersteller eines dieser Tests (PrioCheck *Besnoitia* Ab V1.0) wurden zwei Cut-offs angegeben: ELISA PP Werte von $\geq 20\%$ wurden als positiv erachtet, Werte von $< 10\%$ als negativ. Werte von 10% bis 19% sollten als fraglich erachtet und Rinder, von denen diese Seren stammten, sollten erneut serologisch untersucht werden. Bei $\geq 20\%$ erreichte der erwähnte Test eine Sensitivität von bis zu 75% und eine Spezifität von 96,8% (Schares *et al.* 2011a).

9.2.3 Immunoblots/Westernblots

Bei der serologischen Untersuchung mittels Westernblot werden Antigenpräparationen aus Tachyzoiten und Bradyzoiten verwendet (Shkap *et al.* 2002; Cortes *et al.* 2006b; Fernández-García *et al.* 2010; Schares *et al.* 2010; Schares *et al.* 2011a). Cortes und Mitarbeiter verwendeten Tachyzoiten-Antigen und erachteten mindestens vier Banden in drei Antigen-Bereichen als positiv. Sensitivität und Spezifität betrugen in diesem Fall 91,3% beziehungsweise 96,4% (Cortes *et al.* 2006b). Schares und Mitarbeiter etablierten zwei Tests, bei einem dienten Tachyzoiten und beim anderen Bradyzoiten als Antigen. Eine Serumreaktion wurde dann als positiv erachtet, wenn mindestens vier von zehn vorher als nicht-kreuzreaktiv ermittelten Antigenbanden erkannt wurden. Die Sensitivität beziehungsweise Spezifität des Tachyzoiten-Immunoblots lag bei 90,3% beziehungsweise 100%. Im Fall des auf Bradyzoiten-Antigen basierenden Blots wurden Sensitivität beziehungsweise Spezifität mit 90,3% beziehungsweise 99,5% angegeben (Schares *et al.* 2010).

9.3 Diagnostik mittels PCR

Für den Nachweis von *B. besnoiti* DNA stehen sowohl konventionelle als auch SYBR®Green und auf der 5'-Nukleaseaktivität der verwendeten Polymerase basierende Real Time-PCRs zur Verfügung (Cortes *et al.* 2006a; Cortes *et al.* 2007b; Schares *et al.* 2009; Schares *et al.* 2011b). Alle PCRs fußen auf dem Nachweis von Fragmenten der ITS-1 Sequenz (internal transcribed spacer), des nukleären rDNA Gens. Die ITS-1 Sequenz von *B. besnoiti* ist identisch mit den Sequenzen anderer *Besnoitia* spp., die bei Ungulaten parasitieren: *B. bennetti*, *B. tarandi* und *B. caprae* (Schares *et al.* 2011b).

Zwei 5'-Nuklease-Assays von Schares und Mitarbeitern wurden dazu verwendet, um *B. besnoiti* DNA in Haut, Blut und Vaginal-Abstrichen nachzuweisen. Beide Tests besitzen eine hohe analytische Sensitivität. Es lassen sich DNA-Konzentrationen von 0,01 ng nachweisen. Die DNA-Menge entspricht in etwa der DNA von 0,1 Parasiten. Die analytische Sensitivität der Real Time-PCR war höher als die zum Vergleich verwendete konventionelle PCR (Schares *et al.* 2011b).

9.4 Diagnostik mittels Histologie und Elektronenmikroskopie

Während des akuten Stadiums können erfahrene Pathologen in Rinderhaut-Biopsien Tachyzoiten histologisch nachweisen (Bigalke 1981). Bei Rindern, die während des akuten Stadiums sterben, lassen sich Tachyzoiten in zahlreichen Organen histologisch nachweisen (Basson *et al.* 1970), siehe dazu auch **Tabelle II-1**, S. 28.

Im chronischen Stadium lässt sich die histologische Diagnose am HE-gefärbten Schnitt durch den Nachweis der typischen Zysten in diversen Geweben (siehe **Tabelle II-2**, S. 30) leicht stellen.

Elektronenmikroskopisch können Bradyzoiten und Zysten in der Haut leicht dargestellt werden (Dubey *et al.* 2003a; Mehlhorn *et al.* 2009; Majzoub *et al.* 2010).

9.5 Weitere Möglichkeiten der Diagnostik

Die hier aufgeführten Methoden eignen sich nicht zur Routinediagnostik, da sie einerseits schwierig zu praktizieren sind und eine erhebliche Verletzungsgefahr für Untersucher und Patient darstellen (Konjunktiva-Geschabsel).

Gefärbte Ausstriche von Blut und Tränenflüssigkeit lassen nur den Nachweis von Zooten zu, eine Speziesbestimmung ist nicht möglich.

9.5.1 Haut-Ausstrich und Konjunktiva-Geschabsel

Für die Arbeit im Feld kann die klinische Verdachtsdiagnose mit zwei schnellen Tests zum Nachweis von Bradyzooten bestätigt werden: der Ausstrich von Hautbiopsien und das sklerale Konjunktiva-Geschabsel.

Von den Hautbiopsien wird die epidermale Schicht entfernt und die restliche Biopsie in Scheiben geschnitten. Die einzelnen Scheiben werden mit einer Arterienklemme festgehalten und auf Objektträger ausgestrichen. Die Ausstriche werden luftgetrocknet, in Methanol fixiert und nach Giemsa gefärbt (Sannusi 1991).

Für die Geschabsel der skleralen Konjunktiva ist gute Beleuchtung und gute Fixation des Kopfes notwendig. Makroskopisch sichtbare Zysten in der skleralen Konjunktiva werden mit der Kante eines Glas-Objektträgers oder einem Skalpell abgeschabt und auf Objektträger ausgestrichen. Die weitere Verarbeitung erfolgt wie bei den Biopsie-Ausstrichen (Sannusi 1991).

9.5.2 Untersuchung der Tränenflüssigkeit

In einem Fall ließen sich Merozooten von *B. besnoiti* auch lichtmikroskopisch in nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Ausstrichen vom Tränensekret eines infizierten Bullen nachweisen (Cortes *et al.* 2003).

9.5.3 Untersuchung von Blutausstrichen

Tachyzooten von *B. besnoiti* können über mehrere Tage in nach Giemsa gefärbten Blutausstrichen intra- oder extrazellulär nachgewiesen werden. Blutausstriche von chronisch infizierten Tieren können Bradyzooten von punktierten Zysten enthalten (Bigalke 1981). Auch bei experimentell infizierten Labortieren können im nach Giemsa gefärbten Blutausstrich Tachyzooten nachgewiesen werden (Schaes *et al.* 2009).

10 Immunhistochemische Untersuchungen an *B. besnoiti*-Zysten und *Besnoitia* spp.-Endozoiten

Es gibt wenige Berichte über immunhistochemische Untersuchungen an Zysten von *B. besnoiti*.

Irigoien und Mitarbeiter untersuchten folgende Proteine und Enzyme an Zysten und Bradyzoiten von *B. besnoiti*: Na⁺/K⁺-ATPase, alkalische Phosphatase, Kalzium-bindende Proteine (Calmodulin und S-100) und zwei Hitzeschock-Proteine (hsp60 und hsp70). Alle oben genannten Marker reagierten positiv in den Bradyzoiten, die Wirtszelle reagierte nur auf Na⁺/K⁺-ATPase positiv. Sowohl positive als auch ungefärbte Zysten und Bradyzoiten wurden im selben Schnitt beobachtet (Irigoien *et al.* 2000).

Die Wirtszelle im chronischen Stadium wurde durch Verwendung von anti-Vimentin und anti-Calprotectin (Klon: MAC387) Antikörper immunhistochemisch charakterisiert. Wirtszellen reagierten positiv für Vimentin, ein für mesenchymale Zellen typisches Intermediärfilament, und negativ für Calprotectin, ein myelomonozytäres Antigen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass es sich bei den Wirtszellen möglicherweise um Fibroblasten handelt (Majzoub *et al.* 2010).

Endozoiten von *B. bennetti*, *B. neotomofelis* und *B. oryctofelisi* wurden mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum direkt immunhistochemisch nachgewiesen.

Bradyzoiten und parasitophore Vakuole von *B. bennetti*-Gewebezysten sowie Tachyzoiten reagierten positiv bei Verwendung eines polyklonalen Kaninchenantisera in einer Verdünnung von 1:8000 beziehungsweise 1:500. Ein am selben Gewebe verwendeter Bradyzoiten-spezifischer Kaninchen-Antikörper, gerichtet gegen ein Hitzeschock-Protein von *T. gondii* und *N. caninum* (BAG-1, Verdünnung 1:10000), reagierte nur bei Bradyzoiten (Dubey *et al.* 2005).

Alle Stadien von *B. neotomofelis* reagierten immunhistochemisch positiv bei Verwendung eines polyklonalen Kaninchenantisera gegen *B. oryctofelisi* in einer Verdünnung von 1:10000. Nur *B. neotomofelis*-Bradyzoiten reagierten mit oben genannten anti-BAG-1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 (Dubey und Yabsley 2010).

Tachyzoiten, Bradyzoiten und parasitophore Vakuole von *B. oryctofelisi* reagierten immunhistochemisch positiv bei Verwendung eines polyklonalen Kaninchenantiseraums gegen *B. oryctofelisi* in einer Verdünnung von 1:40000. Nur *B. oryctofelisi*-Bradyzoiten reagierten mit dem anti-BAG-1-Antikörper (Verdünnung 1:10000) aus dem Kaninchen (Dubey und Lindsay 2003).

11 Behandlung

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine zufriedenstellende Behandlung der bovinen Besnoitiose. Sulfonamide und Tetrazykline werden verwendet, die Behandlung führt jedoch nicht zu einer Heilung (Jacquiet *et al.* 2010; Liénard *et al.* 2011).

Die Behandlung von i.p. mit *B. besnoiti* infizierten Gerbils (*Meriones tristrami shawii*) mit Sulfonamiden (Sulfamerazin, Sulfamezathin, Sulfadoxin, Sulfadiazin) alleine oder in Kombination mit Pyrimethamin oder Trimethoprim sowie Pentamidin, Diminazen und Halofuginon erbrachte keinen kurativen Effekt (Shkap *et al.* 1987b). Sulfonamide erzeugten auch bei experimentell mit *B. besnoiti* infizierten Kaninchen keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Pols 1960). Jedoch konnte gezeigt werden, dass sich Gerbils mit einer Oxytetrazyklin-Behandlung von akuter Besnoitiose heilen lassen (Shkap *et al.* 1987b). Oxytetrazyklin-Behandlung von Kaninchen reduzierte auch die Symptomatik einer experimentell i.p. ausgelösten *B. besnoiti* Infektion mit einem bovinen Stamm (Shkap 1985).

Halofuginon inhibierte die Multiplikation von in Vero-Zellkulturen vermehrten *B. besnoiti*-Endozoiten, Oxytetrazyklin-Administration zeigte in vivo keinen Effekt (Shkap *et al.* 1987b). Nitazoxanid und seine Derivate erzeugten einen hemmenden Effekt auf die intrazelluläre Multiplikation von *B. besnoiti* Tachyzoiten in Vero-Zellkulturen. Darüber hinaus hatte Nitazoxanid auch einen inhibitorischen Effekt auf den Mechanismus der Wirtszellinvasion (Cortes *et al.* 2007a).

12 Prognose

In betroffenen Herden zeigt nur ein geringer Teil der infizierten Rinder klinische Symptome, und die Letalität ist gering (Pols 1960; Bigalke 1968; Fouquet 2009). Die Prognose der Krankheit hängt ab vom Grad der Infektion. Eine schlechte Prognose besteht für hochgradig infizierte Tiere mit ausgeprägter klinischer Symptomatik und sekundären Begleiterkrankungen. Diese Tiere werden häufig euthanasiert, weil sie leiden und eine Besserung nicht eintritt (Gentile *et al.* 2010).

Eine Heilung der Erkrankung ist nicht möglich, Zysten in infizierten Tieren persistieren wahrscheinlich lebenslang (Pols 1960).

13 Prävention

Die Einschleppung der bovinen Besnoitiose geschieht sehr wahrscheinlich durch chronisch infizierte Tiere (Bigalke 1968). Die Identifikation infizierter Tiere ist deshalb essentiell für die Kontrolle der Ausbreitung und das Verhindern der Einschleppung. Sowohl kommerzielle als auch nicht-kommerzielle serologische Verfahren stehen hierfür zur Verfügung (Cortes *et al.* 2006b; Fernández-García *et al.* 2010; Schares *et al.* 2010; Liénard *et al.* 2011; Schares *et al.* 2011a), siehe hierzu auch Abschnitt 9.2, S.41.

Da chronisch infizierte Rinder als Infektionsquelle für andere Tiere fungieren, kann die Ausbreitung der Krankheit innerhalb einer Herde durch Isolation und Merzung infizierter Trägartiere kontrolliert werden (Bigalke 1968).

Die Möglichkeit der Vakzinierung wurde oben bereits angesprochen, jedoch steht diese in Europa nicht zur Verfügung.

III. MATERIAL UND METHODEN

1 Versuchsaufbau und Untersuchungsmaterial

1.1 Übertragungsversuch

In den Monaten August bis November 2009 wurde ein Übertragungsversuch durchgeführt, um die Übertragung von *B. besnoiti* von chronisch infizierten Rindern auf naive Rinder in unserer Klimazone zu studieren. Für den Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern eine Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.05.1998 (BGBl S. 1105) erteilt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-83-09).

Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war es, die klinischen und pathomorphologischen Veränderungen der akuten und chronischen bovinen Besnoitiose zu dokumentieren. Hierbei handelte es sich nur um einen Teilaspekt des gesamten Übertragungsversuches. Deshalb werden im Folgenden nur die Teile des Versuchsaufbaus dargestellt, die für die Durchführung der Untersuchungen mit oben genanntem Ziel erforderlich waren.

Die Untersuchungen erfolgten in dem Betrieb, in dem in Deutschland erstmalig die bovine Besnoitiose diagnostiziert wurde. Alle nachfolgend erwähnten Limousinrinder stammten aus diesem Betrieb.

Fünf nicht tragende Fleckviehkalbinnen (VT3, VT4, VT6, VT8 und VT9) und ein Fleckviehbulle (VT1) im Alter von zwölf bis 20 Monaten wurden nach einer zwölf-tägigen Quarantänezeit zusammen mit drei mittelgradig chronisch mit *B. besnoiti*-infizierten nicht tragenden Mutterkühen der Rasse Limousin auf einer Weide gestellt. Während des gesamten Versuchszeitraums (18.08.2009-09.11.2009), inklusive der vorangegangenen Quarantänezeit, wurden alle Tiere täglich untersucht und in regelmäßigen Abständen beprobt. Um einen möglichst intensiven Kontakt der Rinder untereinander zu gewährleisten wurde der Sexualzyklus aller weiblichen Tiere hormonell synchronisiert und verkürzt, sodass sich nahezu täglich eine Kalbin in Brunst befand.

Die Fleckviehrinder wurden aus Betrieben gekauft, in denen keine Anzeichen auf das Vorhandensein der bovinen Besnoitiose festgestellt werden konnte. Alle Fleckviehtiere

waren serologisch negativ auf Antikörper gegen *B. besnoiti* und BHV-1 sowie BVDV-Antigen. Nach Beendigung der Untersuchungen wurden alle Fleckviehrinder der Schlachtung zugeführt.

Während des Versuchszeitraums wurden vom Besitzer der Herde zwei weitere Limousinrinder (VT20 und VT22) im Alter von vier Jahren vorgestellt. Die Tiere wurden vom Besitzer bemerkt, da sie Symptome der akuten Besnoitiose zeigten und sich von der Herde absonderten. Beide Rinder wurden in die Versuchstierherde integriert.

1.1.1 Untersuchungen

Alle Fleckviehrinder wurden täglich klinisch untersucht, jeweils montags und donnerstags wurde eine umfangreiche Untersuchung durchgeführt (Status-Untersuchung, siehe Abschnitt 2.1.1, S. 54) und Blut- sowie Hautstanzproben entnommen. Zeigte ein Tier Symptome, die im akuten Stadium zu erwarten waren oder gelang der Nachweis von Antikörpern gegen *B. besnoiti* im Serum, so wurde es bis zum Versuche jeden Tag nach dem Status-Protokoll untersucht. Kriterien für das akute Stadium waren: Fieber ($>39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), Ödeme, Lymphknotenschwellung, Nasen- und/oder Augenausfluss und steifer Gang.

An allen anderen Tagen wurden alle Fleckviehrinder nach dem Tages-Protokoll (siehe Abschnitt 2.1.2, S. 55) untersucht. Die Tages-Untersuchung wurde nach einem etwas kürzeren Protokoll durchgeführt.

Limousin-Mutterkuh VT20 wurde am 20.08.2009 in die Versuchsherde integriert und bis zum 09.11.2009 täglich untersucht. Bis zum 09.10.2009 wurde täglich eine umfangreiche Statusuntersuchung durchgeführt, danach wurde das Tier nach dem Tages-Protokoll untersucht. Hautstanzbiopsien wurden bis zum 09.10.2009 täglich, danach mit dem gleichen Abstand wie bei den Fleckviehrindern entnommen.

Limousin-Mutterkuh VT22 wurde am 07.10.2009 eingestellt und bis zum 09.11.2009 sechsmal untersucht (Status-Untersuchung) und beprobt.

Nach Beendigung des Versuches, wurden die Fleckviehrinder VT4, VT6 und VT8 im Betrieb aufgestellt, um sie nach guter Anfütterung über den Winter im Frühjahr der Schlachtung zuzuführen. Somit ergab sich die Möglichkeit die Tiere weiterhin zu untersuchen und im Rahmen des Bestandsmonitorings zu beproben.

Zwischen dem 16.11.2009 und dem 30.03.2010 wurden die Tiere VT4, VT6 und VT8 in ca. zweiwöchigem Abstand untersucht. VT20 und VT22 wurden ab dem 15.12.2009 in ca. zweiwöchigen Abstand untersucht.

Im Rahmen des Bestandsmonitorings der mit Besnoitiose infizierten Herde, wurde bei VT4 und VT6 am 15.12.2009 eine Blut- und Hautprobe, bei VT8, VT20 und VT22 am 15.12.2009 eine Blutprobe und am 29.12.2009 eine Hautprobe entnommen.

Bei der Frühjahrsuntersuchung des Bestandes am 18.03.2010 wurde bei VT4, VT6, VT8 und VT20 eine Blut- und Hautprobe entnommen.

1.1.2 Behandlungen

Die Versuchsrinder, die sich im akuten Stadium befanden, wurden über diesen Zeitraum mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (0,5 mg/kg s.c. Meloxicam, Metacam® 20mg/ml, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein) behandelt. In regelmäßigen Abständen wurde bei allen Fleckviehrindern und bei VT20 und VT22 Klauenpflege und gegebenenfalls Klauenbehandlung durchgeführt. Rinder, die tiefreichende, schmerzhaft Veränderungen an den Klauen aufwiesen, wurden zusätzlich mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (0,5 mg/kg s.c. Meloxicam, Metacam® 20mg/ml, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein) versorgt. Des Weiteren wurde eine dem Heilungsprozess förderliche Aufstallung gewährleistet.

1.1.3 Probenentnahme

Zum Zeitpunkt jeder Status-Untersuchung wurden den Tieren Blutproben und Hautstanzbiopsien entnommen. Tieren, die Kriterien des akuten Stadiums erfüllten, wurde über einen Zeitraum von drei Wochen täglich Blut entnommen und mindestens alle zwei Tage wurde die Haut bioptiert.

Blut- und Serumproben wurden mit dem BD-Vacutainer™-System (Becton Dickenson, Plymouth, UK) aus einer der Halsvenen oder der Schwanzvene entnommen.

Für die Entnahme der Hautstanzbiopsien wurde das Haarkleid entfernt, die Biopsie-Stelle gereinigt und mit dem Lokalanästhetikum Procasel® (Procain-Hydrochlorid, Selectavet, Dr. Fischer GmbH, Weyarn/Holzolling) subkutan infiltriert. Die Entnahme erfolgte mit 8-mm-Hautstanzen (Biopsy Punch, pfm medical ag, Köln). Die Hautstanzbiopsien wurden

alternierend links und rechts am gut bemuskelten Teil der Hintergliedmaßen entnommen, in einzelnen Fällen wurde auch Haut am Trierl oder an den Schultergliedmaßen biopsiert. Es wurden immer zwei Hautstanzbiopsien entnommen, eine für die Untersuchung mittels PCR und eine für die histologische Untersuchung.

1.1.4 Probenbearbeitung

1.1.4.1 Serum

Serum zur Untersuchung auf *B. besnoiti*-Antikörper wurde bei -80°C eingefroren.

1.1.4.2 Hautproben für die PCR

Bis zur Untersuchung mittels Real Time-PCR wurden die nativen Hautstanzbiopsien bei -80°C eingefroren.

1.1.4.3 Hautproben für die histologische Untersuchung

Die Hautstanzbiopsien wurden direkt nach der Entnahme 24 Stunden lang gekühlt in 4%igem, gepufferten Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Hautproben in 1-2 mm dicke Scheiben geschnitten und in Einbettungskassetten verbracht. Eine Scheibe wurde in Kunststoff eingebettet, die verbleibenden in Paraffin.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Proben der Haut von VT20 aus dem akuten Stadium auf eine Größe von ca. 1 × 1 × 2 mm zugeschnitten und wie in Abschnitt 2.5.1 (S. 60) beschrieben weiterverarbeitet.

1.2 Sektion

Limousinrind VT20 wurde am 07. Juni 2010, Limousinrind VT22 am 13. April 2010 im Institut für Tierpathologie der LMU München seziert.

Bei der Sektion entnommene Organproben wurden 24 Stunden lang auf einem Taumler in 4%igem Formalin (SAV Liquid Production, Flintsbach a. Inn) fixiert, in ca. 3 mm dicke und 1 cm² große Gewebestücke geschnitten, in Einbettungskassetten verbracht und in Paraffin und Kunststoff eingebettet.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Proben von Haut und Faszie der seziierten Rinder auf eine Größe von ca. 1 × 1 × 2 mm zugeschnitten, 2-4 Stunden in

6,25%iger Glutardialdehydlösung bei 4°C fixiert und wie in Abschnitt 2.5.1 (S. 60) beschrieben weiterverarbeitet.

1.3 GKO-Mäuse

Organproben von 26 experimentell mit *B. besnoiti* infizierten GKO-Mäusen wurden freundlicherweise von Dr. Gereon Schares (Institut für Epidemiologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen) zur Verfügung gestellt und in 10%igem Formalin an das Institut für Tierpathologie der LMU München versandt.

Die GKO-Mäuse wurden zur Isolation von *B. besnoiti* verwendet. Hierfür wurden sie intraperitoneal (i.p.) mit Bradyzoiten aus chronisch infizierter Rinderhaut beziehungsweise Tachyzoiten aus Peritonealspülflüssigkeit experimentell infizierter GKO-Mäuse infiziert. Die Proben wurden in ca. 3 mm dicke und 0,5 cm² große Gewebestücke geschnitten, in Einbettungskassetten verbracht und in Paraffin und Kunststoff eingebettet.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Proben von Haut und Leber auf eine Größe von ca. 1 × 1 × 1 mm zugeschnitten und wie in Abschnitt 2.5.1 (S. 60) beschrieben weiterverarbeitet.

1.4 Immunhistochemische Kontrollen

Folgende Spezifitäts-Kontrollen wurden bei den immunhistochemischen Untersuchungen verwendet:

Tachyzoiten von *T. gondii*: Organe von drei experimentell mit *T. gondii* infizierten GKO-Mäusen, die freundlicherweise von Dr. Gereon Schares (Institut für Epidemiologie, FLI, Wusterhausen) zur Verfügung gestellt wurden.

Bradyzoiten von *T. gondii*: Gehirn einer chronisch mit *T. gondii* infizierten Katze. Diese Gehirnschnitte stammen aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie und werden als Positiv-Kontrolle der anti-*Toxoplasma*-Immunhistochemie verwendet.

Tachyzoiten von *N. caninum*: Homogenisiertes Rinderhirn, das mit Tachyzoiten aus Zellkultur versetzt und freundlicherweise von Dr. Gereon Schares (Institut für Epidemiologie, FLI, Wusterhausen) zur Verfügung gestellt wurde.

Bradyzoiten von *N. caninum*: Gehirn eines chronisch mit *N. caninum* infizierten Hundes. Diese Gehirnschnitte stammen aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie und werden als Positiv-Kontrolle der anti-*Neospora*-Immunhistochemie verwendet.

Sarcocystis-Gewebezysten: Muskeln von Tieren, aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie stammend, bei denen lichtmikroskopisch ein Befall mit *Sarcocystis* spp. nachgewiesen wurde.

2 Methoden

2.1 Untersuchungsmethoden

Zwei Untersuchungsprotokolle wurden für die Untersuchung der Rinder verwendet. Ein ausführliches Protokoll (Status-Untersuchung) und ein kürzeres Untersuchungs-Protokoll (Tages-Untersuchung).

2.1.1 Status-Untersuchung

Bei der Status-Untersuchung wurde mittels einer umfangreichen Untersuchung der Gesundheitsstatus des entsprechenden Rindes erhoben. Ein spezielles Augenmerk wurde auf Organsysteme gelegt, die in den unterschiedlichen Stadien der bovinen Besnoitiose hauptsächlich betroffen sind, wie beispielsweise Haut, sklerale Konjunktiven oder periphere Lymphknoten. Das Gangbild der Tiere wurde in Anlehnung an den Lahmheits-Score von Sprecher und Mitarbeitern mittels eines Scoring-Systems von eins bis fünf beurteilt (Sprecher *et al.* 1997). Der Score „eins“ stand für normale Haltung und Gangbild, zwei bis fünf stellten eine graduelle Verschlechterung von Haltung und Gangbild dar. Die Beurteilung der Körperkondition (Body Condition) wurde in Anlehnung an Edmonson und Mitarbeiter beurteilt (Edmonson *et al.* 1989). Hierbei handelt es sich um ein mehrstufiges Scoring-System das in Viertel-Schritten von eins (mangelernährt) bis fünf (fettleibig) reicht.

Sollten Zysten in der skleralen Konjunktiva oder im *Vestibulum vaginae* auftreten, so wurde deren Anzahl geschätzt. Kategorie eins entsprach einer Zystenanzahl von eins bis fünf, Kategorie fünf einer Zystenanzahl von über 30.

Das Protokoll für die Status-Untersuchung ist im Anhang einsehbar (siehe Abschnitt IX.2.1, S. 196).

2.1.2 Tages-Untersuchungs-Protokoll

Die Tages-Untersuchung wurde nach einem kürzeren Protokoll durchgeführt. Hier lag das Hauptaugenmerk auf Veränderungen, die auf ein akutes Krankheitsgeschehen hinweisen. Insbesondere auf klassische Symptome des akuten Stadiums der bovinen Besnoitiose wurde hier geachtet, wie beispielsweise Erhöhung der Rektaltemperatur, Abweichungen im Gangbild oder Konjunktivitis.

Das Protokoll für die Tages-Untersuchung ist im Anhang einsehbar (siehe Abschnitt IX.2.2, S. 197).

2.2 Einbettungsverfahren

2.2.1 Paraffin-Einbettung

In einem Einbettungsautomaten (Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Birkenau) wurden die Proben entwässert und eingebettet:

30 Minuten	spülen mit Aqua dest.
2 × 1,5 Stunden	70%iges Ethanol
2 × 1,5 Stunden	96%iges Ethanol
2 × 1,5 Stunden	100%iges Ethanol
2 × 30 Minuten	Xylol
1,5 Stunden	Xylol
2 Stunden	Paraffin 60°C
3 Stunden	Paraffin 60°C

Das Ausgießen in Paraffinblöcke erfolgte an einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding, MEDITE GmbH, Burgdorf).

2.2.2 Kunststoffeinbettung

Nach Fixierung wurden die Proben für drei Stunden in einer Spülflüssigkeit (siehe Abschnitt IX.4.1, S. 198) gewaschen und in einem Einbettungsautomaten (Citadel 1000, Shandon GmbH, Frankfurt) folgendermaßen entwässert:

2 × 1 Stunde 30%iges Ethanol

2 × 1 Stunde 50%iges Ethanol

2 × 2 Stunden 70%iges Ethanol

2 × 2 Stunden 96%iges Ethanol

2 × 3 Stunden 96%iges Ethanol

Danach wurden die Proben für 24 h bei 4°C auf einem Taumler (Modell 4010, Köttermann GmbH, Uetze/Hänigsen) in ein 1:1 Gemisch aus Methacrylsäure-2-hydroxyester (GMA, Fluka-Nr. 64170) und Methacrylsäuremethylester (MMA, Fluka-Nr. 64200) inkubiert. Anschließend erfolgte die Verbringung in das Einbettungsmedium (siehe Abschnitt IX.4.2, S. 199) für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur. In luftdicht verschließbaren Polyethylen-Probenbehältern fand die Polymerisation statt, hierfür wird pro 40 ml Einbettungsmedium 60 µl N,N-Dimethylanilin (Merck, Darmstadt, Nr. 803060) zugegeben. In einem gekühlten Wasserbad erfolgte die Ableitung der Polymerisationswärme.

2.3 Schnitthanfertigung und Färbung bei der Paraffineinbettung

An einem Rotationsmikrotom (HM 315, Mikrom GmbH, Berlin) wurden 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einem Wasserbad (Daglef Patz) gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und für 24 Stunden bei 40°C in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) getrocknet.

Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) und Färbung nach Giemsa wurden als Übersichtsfärbungen angefertigt, in einigen Fällen wurden zusätzlich noch eine Masson-Goldner-Färbung und eine PAS-Reaktion durchgeführt.

Nach 15-minütiger Entparaffinierung in Xylol wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, Aqua dest.) rehydriert und anschließend gefärbt.

2.3.1 Häkalaun-Eosin-Färbung

5 Minuten Mayers Häkalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)

5 Minuten warm wässern

Differenzieren in 0,5%igen HCl-Ethanol-Lösung (siehe Abschnitt IX.5.3.1, S. 199)

5 Minuten warm wässern

2-7 Mal in Eosin-Lösung (siehe Abschnitt IX.5.3.2, S. 199) eintauchen

Spülen mit Aqua dest.

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (Aqua dest., 70%, 96%, 100%)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

2.3.2 Giemsa-Färbung

1 Stunde Giemsa-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.5.4.1, S. 200) im
Wasserbad bei 65°C

Spülen in Aqua dest.

Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure (siehe Abschnitt IX.5.4.2, S. 200) bis zum
Farbumschlag von blau nach rot

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (96%, 100%)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

2.3.3 PAS-Reaktion

10 Minuten 1%ige Perjodsäure (siehe Abschnitt IX.5.5.1, S. 200)

10 Minuten kalt wässern

In Aqua dest. spülen

30 Minuten Schiff-Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nr. X.900.2)

5 Minuten warm wässern

2 Minuten Mayers Hämalan (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)

5 Minuten warm wässern

Differenzieren in 0,5%igen HCl-Ethanol-Lösung (siehe Abschnitt IX.5.5.2, S. 200)

5 Minuten warm wässern

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (96%, 100%)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

2.3.4 Masson-Goldner-Färbung

5 Minuten Weigerts Eisenhämatoxylin (siehe Abschnitt IX.5.6.1, S. 201)

5 Minuten warm wässern

Differenzieren in 0,5%iger HCl-Ethanol-Lösung (siehe Abschnitt IX.5.6.4, S. 202)

5 Minuten warm wässern

5 Minuten „Rote Farbe“ (siehe Abschnitt IX.5.6.3, S. 201)

Spülen in 0,5%iger Essigsäure (siehe Abschnitt IX.5.6.4, S. 202)

3-10 min Phosphorwolframsäure-Orange G (siehe Abschnitt IX.5.6.5, S. 202)

Spülen in 0,5%iger Essigsäure (siehe Abschnitt IX.5.6.4, S. 202)

5 Minuten Anilinblau (siehe Abschnitt IX.5.6.6, S. 202)

Spülen in 0,5%iger Essigsäure (siehe Abschnitt IX.5.6.4, S. 202)

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (96%, 100%)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

Die Schnitte wurden mit einem Mikroskop (DM 1000, Leica, Wetzlar) beurteilt.

2.4 Schnitterfertigung und Färbung bei der Kunststoffeinbettung

An einem Rotationsmikrotom (HM360, Mikrom GmbH, Berlin) wurden die Schnitte angefertigt und auf einer Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA) getrocknet.

Als Übersichtsfärbung wurden HE-Färbung und Färbung nach Giemsa verwendet, in den meisten Fällen wurde zusätzlich noch eine PAS-Reaktion durchgeführt.

2.4.1 Hämalan-Eosin-Phloxin-Färbung

5 Minuten Mayers Hämalan (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)

10 Minuten wässern

Differenzieren in 1%iger HCl-Ethanol-Lösung (siehe Abschnitt IX.6.1.1, S. 202)

10 Minuten wässern

Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA) bei 60°C

20 Minuten Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.6.1.4, S. 203)

Spülen in Aqua dest.

Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA) bei 60°C

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

2.4.2 Giemsa

1 Stunde Giemsa-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.6.2.1, S. 203) im
Wasserbad bei 65°C

Spülen in Aqua dest.

Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure (siehe Abschnitt IX.6.2.2, S. 203) bis zum
Farbumschlag von blau nach rot differenzieren

Spülen in Aqua dest.

Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

2.4.3 PAS-Reaktion

15 Minuten 1%ige Perjodsäurelösung (siehe Abschnitt IX.6.3.1, S. 204)

Spülen mit Aqua dest.

15 Minuten Schiff-Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nr. X.900.2)

30 Minuten warm wässern

Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA)

20 Minuten Mayers Hämalan (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)

10 Minuten wässern

Differenzieren in 1%igen HCl-Ethanol-Lösung (siehe Abschnitt IX.6.3.2, S. 204)

10 Minuten wässern

Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

Die Schnitte wurden mit einem Mikroskop (DM 1000, Leica, Wetzlar) beurteilt.

2.5 Elektronenmikroskopie

2.5.1 Probenvorbereitung

Mäuse- und Rinderproben wurden folgendermaßen vorbereitet:

Mehrmaliges Waschen in Waschlösung (siehe Abschnitt IX.7.1.2, S. 205)

2 Stunden Nachfixation und Kontrastierung in gebrauchsfertigem Fixativ (siehe Abschnitt IX.7.1.3, S. 205)

Waschen in Waschlösung (siehe Abschnitt IX.7.1.2, S. 205)

Dehydrierung in aufsteigender Acetonreihe (50%, 2 × 70%, 2 × 90%, je 10 Minuten;
3 × 100%, je 20 Minuten)

- 1 Stunde Inkubation in Glycidether-Mischung (siehe Abschnitt IX.7.1.4, S. 205) und Aceton (neoLab, Heidelberg, Nr. 2890.2500) im Verhältnis 1:1
- 2 × ½ Stunde Glycidether-Mischung (siehe Abschnitt IX.7.1.4, S. 205)
- Einbettung in Glycidether-Mischung (siehe Abschnitt IX.7.1.4, S. 205) zwei Tage bei 60°C

2.5.2 Anfertigung und Färbung der Semidünnschnitte

Zur Erstellung einer rechteckigen Anschnittfläche erfolgte das Trimmen an einer Trimmeinrichtung (Ultratrim, Reichert, Wien, Österreich). An einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert und Jung, Wien, Österreich) wurden mit einem Histo-Diamantmesser (Diatome, Bienne, Schweiz) ca. 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Wassertropfen auf Objektträgern bei 60°C getrocknet, über einer Flamme fixiert und mit Toluidinblau (siehe Abschnitt IX.7.2.1, S. 206) 45 Sekunden lang gefärbt. Nach Spülung mit Aqua dest. wurde mit Safranin (siehe Abschnitt IX.7.2.2, S. 206) gegengefärbt, die Schnitte getrocknet und mit Glycidether-Mischung (siehe Abschnitt IX.7.1.4, S. 205) eingedeckt.

2.5.3 Anfertigung und Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Nach weiterem Trimmen wurden am Ultramikrotom die ca. 70 nm dicken Ultradünnschnitte angefertigt und auf mit Formvar befilmte Kupfer-Grids aufgezogen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Kontrastierung mit 2%igem Uranylacetat (siehe Abschnitt IX.7.3.1, S. 206). Nach Abspülen mit Aqua dest. und Trocknung fand eine 10-minütige erneute Kontrastierung mit Bleicitrat (siehe Abschnitt IX.7.3.2, S. 206) statt, gefolgt von Abspülen mit Aqua dest. und Trocknung.

An einem Elektronenmikroskop (EM 10, Zeiss, Oberkochen) wurden die Ultradünnschnitte beurteilt und auf Planfilme (ES206, Maco Photo Products, Stapelfeld) abfotografiert.

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie

Als Primärantikörper diente ein polyklonales Antiserum eines experimentell mit *B. besnoiti*-infizierten Kaninchens das freundlicherweise von Dr. Walter Basso (Institut für Parasitologie,

Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich) zur Verfügung gestellt wurde. Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Alle Antiseren wurden mit TBS verdünnt. Falls nicht explizit erwähnt, fanden alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur statt.

2.6.1.1 Immunhistochemie-Protokoll der Paraffinschnitte

Als Tachyzoiten- Positivkontrolle wurden Organschnitte von experimentell infizierten Mäusen verwendet, in denen histologisch *Besnoitia*-Tachyzoiten nachgewiesen worden sind. Als Bradyzoiten-Positivkontrolle wurden Hautschnitte von chronisch mit *B. besnoiti*-infizierten Rindern verwendet. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:2000, in einzelnen Fällen auch in Verdünnungen von 1:4000 und 1:8000 angewendet. Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch einen polyklonalen Kaninchenantikörper gegen *E. coli* (Dako, Hamburg, Nr. B0357) ersetzt und in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Die Spezifität des Serums wurde an Tachyzoiten und Bradyzoiten von *T. gondii* und *N. caninum* sowie an *Sarcocystis*-Gewebezysten überprüft. Hierfür wurde eine Verdünnung von 1:1000 beziehungsweise 1:2000 verwendet.

Nach folgendem Protokoll wurde die Immunhistochemie durchgeführt:

Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 40°C

15 Minuten Entparaffinierung in Xylol

Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, Aqua dest.)

15 Minuten Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.1, S. 207)

10 Minuten Spülen in TBS (siehe Abschnitt IX.8.2, S. 207)

30 Minuten Absättigung von unspezifischen Bindungen mit Ziegennormalserum, Verdünnung 1:10 (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092939149)

60 Minuten Inkubation mit dem Primärantikörper

10 Minuten Spülen in TBS

45 Minuten	Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen-Ig (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:200
10 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Inkubation mit Peroxidase markiertem Avidin-Biotin-Komplex (Vector, Burlingame, USA, Nr. PK-6100), 1:100 verdünnt mit TBS
10 Minuten	Spülen in TBS
5 Minuten	Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208)
5 Minuten	Spülen in Leitungswasser
<1 Minute	Mayers Hämalalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)
5 Minuten	Spülen in Leitungswasser
Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (Aqua dest., 70%, 96%, 100%)	
Einstellen in Xylol	
Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)	

2.6.1.2 Immunhistochemie-Protokoll der Kunststoffschnitte

Die Immunhistochemie wurde an Organschnitten von experimentell infizierten Mäusen und Hautschnitten von akut und chronisch mit *B. besnoiti*-infizierten Rindern nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 40°C	
60 Minuten	Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%iger Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung (siehe Abschnitt IX.8.1.2, S. 207)
10 Minuten	Spülen in TBS (siehe Abschnitt IX.8.2, S. 207)
Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA)	

20-30 Minuten	Vorbehandlung: Epitopdemaskierung mit Proteinase K (Dako, Hamburg, Nr. S3020), vor Verwendung 10 Minuten bei 37°C inkubieren
10 Minuten	Spülen in TBS
30 Minuten	Absättigung von unspezifischen Bindungen mit Ziegennormalserum, Verdünnung 1:10 (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092939149)
120-140 Minuten	Inkubation mit dem Primärantikörper , Verdünnung 1:20 und 1:50
10 Minuten	Spülen in ZPP (siehe Abschnitt IX.8.5, S. 208)
120 Minuten	Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen-Ig (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:50
10 Minuten	Spülen in ZPP
30 Minuten	Inkubation mit Peroxidase markiertem Avidin-Biotin-Komplex (Vector, Burlingame, USA, Nr. PK-6100), 1:100 verdünnt mit TBS
10 Minuten	Spülen in ZPP
7-10 Minuten	Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208)
5 Minuten	Spülen in Leitungswasser
1-2 Minuten	Mayers Hämalalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)
5 Minuten	Spülen in Leitungswasser
Trocknen auf der Heizplatte (Axel Johnson Lab System, New York, USA)	
Einstellen in Xylol	
Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)	

2.6.1.3 Immunhistochemie-Protokoll der Semidünnschnitte

2.6.1.3.1 Allgemeines Protokoll

Für die immunhistochemische Untersuchung der Semidünnschnitte wurden verschiedene Protokolle eingesetzt mit unterschiedlichen Vorbehandlungen, Inkubationszeiten und Konzentrationen der verwendeten Lösungen und Seren. Verwendet wurden Organschnitte von experimentell infizierten Mäusen und Hautschnitte eines chronisch mit *B. besnoiti*-infizierten Rindes. Folgendes allgemeines Schema wurde verwendet:

Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 60°C

Anätzen mit Natriumäthylat (siehe Abschnitt IX.8.4, S. 208)

Abspülen mit 96%igem Alkohol

Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (96%, 70%, Aqua dest.)

Osmiumentfernung in Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1, S. 207)

Blockierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid

10 Minuten Spülen in TBS (siehe Abschnitt IX.8.2, S. 207)

Vorbehandlung: Keine/Epitopdemaskierung (Proteinase, Mikrowelle)

30 Minuten Absättigung von unspezifischen Bindungen mit
Ziegennormalserum, Verdünnung 1:10 (MP Biomedicals,
Eschwege, Nr. 092939149)

Inkubation mit dem Primärantikörper (über Nacht bei 4°C)

10 Minuten Spülen in TBS

Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen-Ig
(Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:200

10 Minuten Spülen in TBS

30 Minuten Inkubation mit Peroxidase markiertem Avidin-Biotin-Komplex
(Vector, Burlingame, USA, Nr. PK-6100), 1:100 verdünnt mit TBS

10 Minuten Spülen in TBS

Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208)

5 Minuten Spülen in Leitungswasser

<1 Minute Mayers Hämalun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)

5 Minuten Spülen in Leitungswasser

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (Aqua dest., 70%, 96%, 100%)

Einstellen in Xylol

Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)

2.6.1.3.2 Protokoll 1

Anhand des Schemas in Abschnitt 2.6.1.3.1 (S. 65) wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

15 Minuten Anätzen mit Natriumäthylat (siehe Abschnitt IX.8.4, S. 208)

10 Minuten Osmiumentfernung in 2%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.3, S. 207)

10 Minuten Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.1, S. 207)

Vorbehandlung:

Keine

10 Minuten Demaskierung mit Proteinase K (Dako, Hamburg, Nr. S3020), vor Verwendung 10 Minuten bei 37°C inkubieren

2 × 10 Minuten Mikrowelle bei 750 Watt für in 0,01 M Citratpuffer pH 6,0 (siehe Abschnitt IX.8.6, S. 209)

Inkubation mit dem Primärantikörper, Verdünnung 1:50 und 1:100

45 Minuten Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:200

15 Minuten Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208)

2.6.1.3.3 Protokoll 2

Anhand des Schemas in Abschnitt 2.6.1.3.1 (S. 65) wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C

30 Minuten Anätzen mit Natriumäthylat (siehe Abschnitt IX.8.4, S. 208)

15 Minuten Osmiumentfernung in 2%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.3, S. 207)

Keine Blockierung der endogenen Peroxidase

Vorbehandlung:

Keine

30 Minuten Demaskierung mit Proteinase K (Dako, Hamburg, Nr. S3020), vor Verwendung 10 Minuten bei 37°C inkubieren

3 × 10 Minuten Mikrowelle bei 750 Watt in Target Retrieval Solution pH 6,0 (Dako, Hamburg, Nr. S1699), 1:10 verdünnt mit Aqua dest.

Inkubation mit dem Primärantikörper, Verdünnung 1:10 und 1:25

45 Minuten Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:50

10 Minuten Spülen in TBS

10 Minuten Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208208)

2.6.1.3.4 Protokoll 3

Anhand des Schemas in Abschnitt 2.6.1.3.1 (S. 65) wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C

30 Minuten Anätzen mit Natriumäthylat (siehe Abschnitt IX.8.4, S. 208)

15 Minuten Osmiumentfernung in 5%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.4, S. 207)

15 Minuten Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.2, S. 207)

Vorbehandlung:

10-30 Minuten Demaskierung mit Proteinase K (Dako, Hamburg, Nr. S3020), vor Verwendung 10 Minuten bei 37°C inkubieren

Inkubation mit dem Primärantikörper, Verdünnung 1:50 (über Nacht bei 4°C)

120 Minuten Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:50

10 Minuten Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208208)

2.6.2 Immunhistochemie zellulärer Marker

2.6.2.1 Allgemeines Protokoll

Es wurden Vimentin, CD3, CD20 und Histiozyten-Antigen (Klon MAC 387) immunhistochemisch dargestellt. Die indirekte Methode wurde bei Vimentin und Histiozyten-Antigen (Klon MAC 387) verwendet, die Avidin-Biotin-Komplex-Methode bei CD3 und CD20. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Folgendes allgemeines Schema wurde verwendet:

Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank (Memmert, Schwabach, Schwabach) bei 40°C

15 Minuten Entparaffinierung in Xylol

Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, Aqua dest.)

Vorbehandlung: Keine/Epitopdemaskierung (Mikrowelle, Proteinase K)

15 Minuten Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%igem Wasserstoffperoxid (siehe Abschnitt IX.8.1.2, S. 207)

10 Minuten	Spülen in TBS (siehe Abschnitt IX.8.2, S. 207)
30 Minuten	Absättigung von unspezifischen Bindungen mit Normalserum
60 Minuten	Inkubation mit dem Primärantikörper
10 Minuten	Spülen in TBS
45 Minuten	Inkubation mit dem Sekundärantikörper
10 Minuten	Spülen in TBS
[Bei der ABC-Methode:	
30 Minuten	Inkubation mit Peroxidase markiertem Avidin-Biotin-Komplex (Vector, Burlingame, USA, Nr. PK-6100), 1:100 verdünnt mit TBS
10 Minuten	Spülen in TBS]
5 Minuten	Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (siehe Abschnitt IX.8.3, S. 208)
5 Minuten	Spülen in Leitungswasser
<1 Minute	Mayers Hämalalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249)
5 Minuten	Spülen in Leitungswasser
Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (Aqua dest., 70%, 96%, 100%)	
Einstellen in Xylol	
Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025)	

2.6.2.2 Makrophagen-Marker: Anti-Histiozyten-Antigen (MAC387)

Anhand des allgemeinen Schemas in Abschnitt 2.6.2.1 wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

Vorbehandlung:

10 Minuten	Epitopdemaskierung mit Proteinase K (Dako, Hamburg, Nr. S3020), vor Verwendung 10 Minuten bei 37°C inkubieren
------------	---

Kaninchennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092941149), Verdünnung 1:10

Primärantikörper Maus Anti-Histiozyten-Antigen-MAC387 (Dako, Hamburg, Nr. M0747), Verdünnung 1:300

Sekundärantikörper Kaninchen Anti-Maus Ig-Peroxidase (Dako, Hamburg, Nr. P0161), Verdünnung 1:100

2.6.2.3 T-Lymphozyten-Marker: Anti-CD3

Anhand des allgemeinen Schemas in Abschnitt 2.6.2.1 wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

Vorbehandlung:

2 × 10 Minuten Epitopdemaskierung in der Mikrowelle bei 750 Watt in Tris/EDTA Puffer pH 9,0 (siehe Abschnitt IX.8.7, S. 209)

Ziegennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092939149), Verdünnung 1:10

Primärantikörper Kaninchen Anti-CD3 (Dako, Hamburg, Nr. A045201), Verdünnung 1:100

Sekundärantikörper biotinylierter Ziege anti-Kaninchen (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:100

2.6.2.4 B-Lymphozyten-Marker: Anti-CD20

Anhand des allgemeinen Schemas in Abschnitt 2.6.2.1 wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

Vorbehandlung: Keine

Ziegennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092939149), Verdünnung 1:10

Primärantikörper Kaninchen Anti-CD20 (LabVision, Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, USA, Nr. RB-9013-P), Verdünnung 1:300

Sekundärantikörper biotinylierter Ziege anti-Kaninchen (Vector, Burlingame, USA, Nr. BA-1000), Verdünnung 1:100

2.6.2.5 Marker mesenchymaler Zellen: Anti-Vimentin

Anhand des allgemeinen Schemas in Abschnitt 2.6.2.1 wurde die Immunhistochemie mit folgenden spezifischen Schritten durchgeführt:

Vorbehandlung:

2 × 10 Minuten Epitopdemaskierung in der Mikrowelle bei 750 in 0,01 M
Citratpuffer pH 6,0 (siehe Abschnitt IX.8.6, S. 209)

Kaninchennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092941149), Verdünnung
1:10

Primärantikörper Maus Anti-Vimentin (Dako, Hamburg, Nr. M0725), Verdünnung
1:300

Sekundärantikörper Kaninchen Anti-Maus Ig-Peroxidase (Dako, Hamburg, Nr. P0161),
Verdünnung 1:100

2.7 Serologie und PCR

Der Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut und Antikörpern im Serum wurden am Friedrich-Löffler-Institut (FLI) in Wusterhausen nach den dort etablierten Methoden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Dr. Gereon Schares zur Verfügung gestellt.

2.7.1 Serologie

Der Nachweis von Antikörpern in den Seren erfolgte mittels IFAT und Immunoblot (Schaes *et al.* 2010). Damit das Serum als seropositiv interpretiert wurde, mussten im Tachyzoiten-Blot oder im Bradyzoiten-Blot vier spezifische Banden erkannt und der IFAT-Titer ≥ 200 sein. Bei einem IFAT-Titer von >200 wurde von einem positiven serologischen Ergebnis ausgegangen.

Nach Serokonversion wurden die Seren über zwei Wochen in Abständen von zwei bis vier Tagen untersucht. Danach erfolgte alle zwei Wochen eine Titerkontrolle bis zum 09.11.2009.

2.7.2 PCR

Mit einem kommerziellen Kit (Macherey-Nagel, NucleoSpin Tissue) wurde aus den Hautproben des Übertragungsversuches DNA extrahiert. Über Nacht wurden 25 mg der Hautproben mit im Kit enthaltener Proteinase K inkubiert und nach den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet.

Die hier verwendete quantitative Real Time-PCR basiert auf dem Nachweis der IST-1 Sequenz mittels 5'-Nuklease-Assay. Die Sensitivität dieser Methode ist sehr hoch, es können 0,01 ng DNA nachgewiesen werden, dies entspricht etwa 0,1 Parasiten (Schaes *et al.* 2011b). Ab einem Ct-Wert von unter 40 wurde von einem positiven Ergebnis ausgegangen.

Der Nachweis der Parasiten-DNA aus der Haut erfolgte nach folgendem Schema: Beginn der Untersuchungen drei Probenentnahmen vor Beginn der klinischen Symptomatik beziehungsweise vor Serokonversion. Je nach Versuchstier wurde damit ein Zeitraum von 15 bis 17 Tagen abgedeckt. Untersuchung aller Proben bis zum histologischen Nachweis der ersten Zyste, danach erfolgte die Untersuchung zur gleichen Zeit wie die serologischen Untersuchungen. Bei VT20 begann die Untersuchung am Tag der Vorstellung, bei VT22 wurden alle Hautproben untersucht.

IV. ERGEBNISSE

1 Übertragungsversuch

Während des zwölfwöchigen Versuchszeitraumes konnten Symptome der akuten Besnoitiose bei zwei der fünf Fleckviehkalbinnen (VT4 und VT6) beobachtet werden. Die Tiere zeigten unter anderem Fieber, Niedergeschlagenheit, Bewegungsunlust, Anorexie, gerötete Schleimhäute, verwaschene Episkleralgefäße und Lahmheit. Bei beiden Tieren wurde die Infektion serologisch, durch Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut und histologisch bestätigt.

Fleckviehkalbin VT8 zeigte keine erkennbaren Anzeichen der akuten Besnoitiose, wurde jedoch im kurz vor Ende des Versuchs bei allen Tieren durchgeführten serologischen Screening als seropositiv identifiziert. Histologisch konnten bei diesem Tier keine Parasitenstadien dargestellt werden. An einzelnen Tagen konnte mittels PCR Parasiten-DNA in der Haut nachgewiesen werden.

Die beiden im akuten Stadium vorgestellten Limousinrinder zeigten im Versuchszeitraum Symptome der akuten und chronischen Besnoitiose: Augenausfluss, Ödeme, Vergrößerung der Lymphknoten, Zysten in den skleralen Konjunktiven und der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* sowie Veränderungen der Haut. Auch hier wurde die Infektion bei beiden Tieren serologisch, durch Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut und histologisch bestätigt.

Der histologische Verlauf der Zystenentwicklung nach natürlicher Infektion wurde dokumentiert. Eine Übersicht der Entwicklung vom Tachyzoiten bis zur reifen Zyste ist in Abschnitt IV.1.6 (S. 108) gegeben.

Die anderen Fleckviehkalbinnen VT3 und VT9 sowie der Fleckviehbulle VT1 zeigten keine klinische Auffälligkeiten, die auf eine Infektion mit *B. besnoiti* hätten schließen lassen. Im Serum konnten keine Antikörper gegen *B. besnoiti* nachgewiesen werden und in der Haut wurde keine Parasiten-DNA detektiert. Diese drei Tiere wurden als nicht mit *B. besnoiti* infiziert eingestuft.

Im Folgenden werden nun die Befunde, die bei den infizierten Tieren erhoben wurden, aufgelistet.

1.1 Versuchstier 4

Das weibliche Fleckviehrind VT4 war zu Beginn des Versuchs 20 Monate alt (*03.12.2007), nicht tragend, klinisch unauffällig, von gutem Ernährungszustand und serologisch negativ für Antikörper gegen *B. besnoiti*.

1.1.1 Klinik

Am Morgen des 23.09.2009 zeigte das Tier eine Erhöhung der Körperinnentemperatur auf 40,7 °C. Die Fieberphase dauerte sechs Tage an und erreichte am zweiten Tag ein Temperaturmaximum von 41,0 °C. Der Füllungszustand des Pansens als Indikator für die Futteraufnahme sank zeitlich versetzt zu der Fieberphase und kehrte wenige Tage danach zum ursprünglichen Füllungszustand zurück (siehe **Abbildung IV-2**, S.75). Über acht Tage war das Allgemeinbefinden des Tieres reduziert und es wirkte niedergeschlagen, über den gleichen Zeitraum zeigte das Tier Anzeichen einer akuten Konjunktivitis. Über fünf Tage hinweg zeigte VT4 geringgradige Lahmheit (siehe **Abbildung IV-1**).

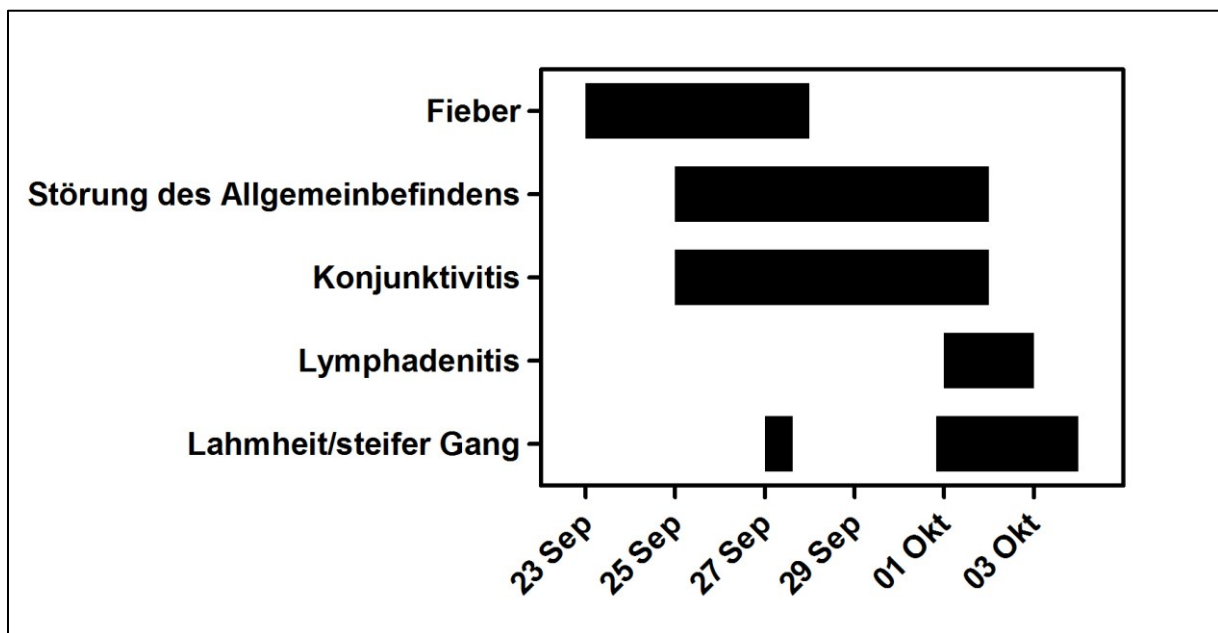


Abbildung IV-1: VT4, akutes Stadium: Übersicht der klinischen Symptome.

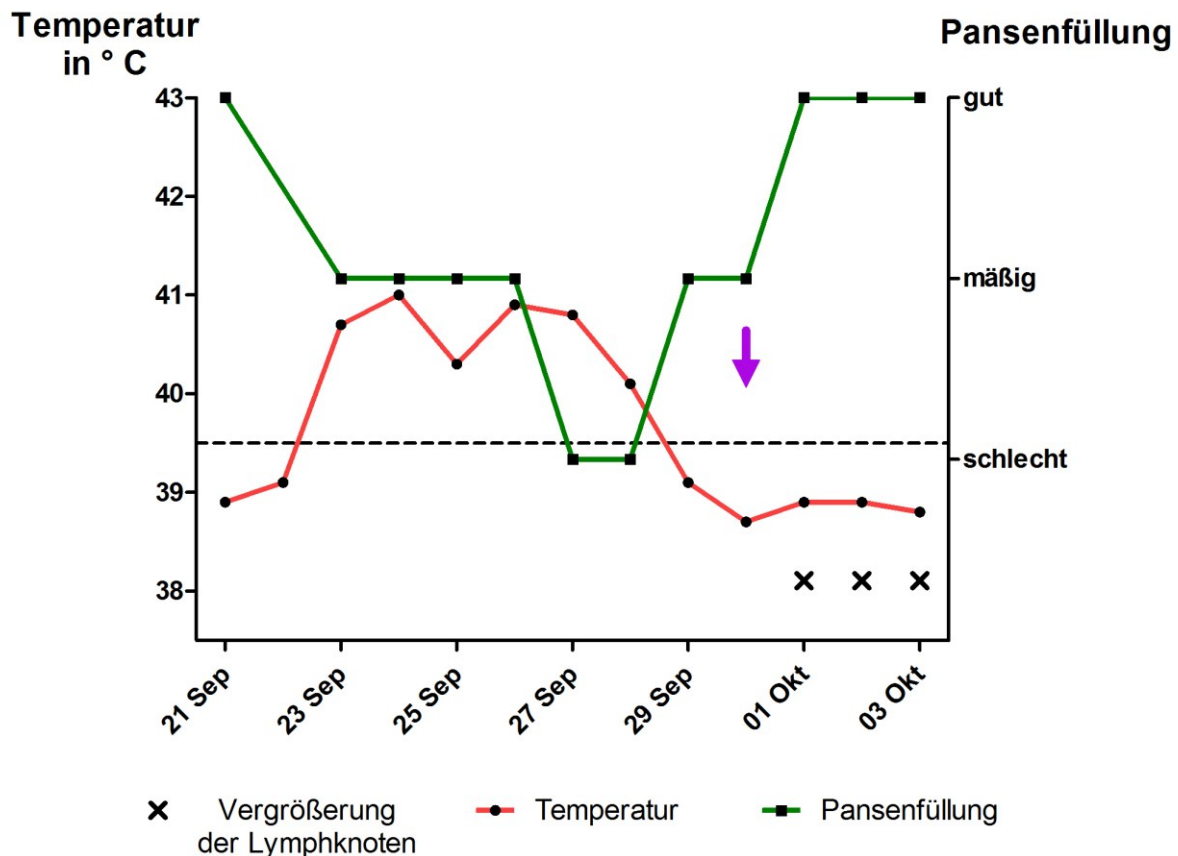


Abbildung IV-2: VT4, akutes Stadium: Rektaltemperatur und Pansenfüllung. An drei Tagen waren die peripheren Lymphknoten geringgradig vergrößert. Der magentafarbene Pfeil markiert das Datum der Serokonversion. Die gestrichelte Linie markiert die Cut-off-Temperatur von 39,5 °C.

An drei Tagen konnte eine Vergrößerung der peripheren Lymphknoten festgestellt werden (siehe **Abbildung IV-2**). Zusätzlich zeigte VT4 eine auffällige Hyperämie des Flotzmauls über elf Tage. Es konnten keine Veränderung der Herz- und Atemfrequenz und keine Ödeme festgestellt werden.

Am 20.10.2009, fast vier Wochen nach Beginn des akuten Krankheitsstadiums, wurden in der skleralen Konjunktiva erstmalig einzelne wenige Zysten gesehen, die sich als winzige, weißliche, disseminierte Herde präsentierten. Ihre Anzahl lag zwischen sechs und zehn (Kategorie 2). Auch bei allen nachfolgenden Untersuchungen lag die Anzahl der Zysten in der skleralen Konjunktiva immer unter zehn. In den folgenden Tagen und Wochen wurden die Zysten größer und somit leichter identifizierbar. In der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* wurden Zysten erst sehr viel später, am 18.03.2010, festgestellt. Auch hier zeigten sie sich als

winzige, weißliche Herde, die nur sehr schwierig zu erkennen waren. Ihre Anzahl lag zwischen eins und fünf (Kategorie 1).

Typische Hautveränderungen der chronischen Besnoitiose konnten bei diesem Tier nicht beobachtet werden. Sowohl im akuten, als auch im chronischen Stadium konnte keine Verminderung des BCS registriert werden.

1.1.2 PCR und Serologie

Der erste Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut erfolgte am ersten Tag der Temperaturerhöhung. In den Proben von drei vorangegangenen Entnahmezeitpunkten, die sich über einen Zeitraum von 16 Tagen erstreckten, wurde keine DNA nachgewiesen. In den folgenden drei Tagen nahm die nachgewiesene DNA-Menge zu (d.h. es wurden sinkende Ct-Werte in der PCR beobachtet) und fiel über die nächsten sechs Tage wieder ab. Eine deutliche Abnahme der Menge an DNA konnte um den Zeitpunkt der Serokonversion beobachtet werden (siehe **Abbildung IV-3**, S. 76).

Am 30.09.2009, sieben Tage nach der ersten Temperaturerhöhung, wurden im Bradyzoiten-Blot drei spezifische Banden nachgewiesen und der reziproke IFAT-Titer lag bei 400, das Tier wurde dennoch als seropositiv eingestuft. Vier Tage später konnten sowohl im Bradyzoiten- als auch im Tachyzoiten-Blot mehr als vier spezifische Banden nachgewiesen werden. Der reziproke IFAT-Titer stieg innerhalb von 13 Tagen auf 1600 und erreichte ein Titermaximum von 3200 am 09.11.2009 (siehe **Abbildung IV-3**, S. 76).

Am 15.12.2009 und 18.03.2010 konnte in beiden untersuchten Proben keine Parasiten-DNA nachgewiesen werden.

Bei diesem Tier konnte eine Abnahme des reziproken IFAT-Titers von 3200 im Dezember auf 1600 im März 2010 beobachtet werden.

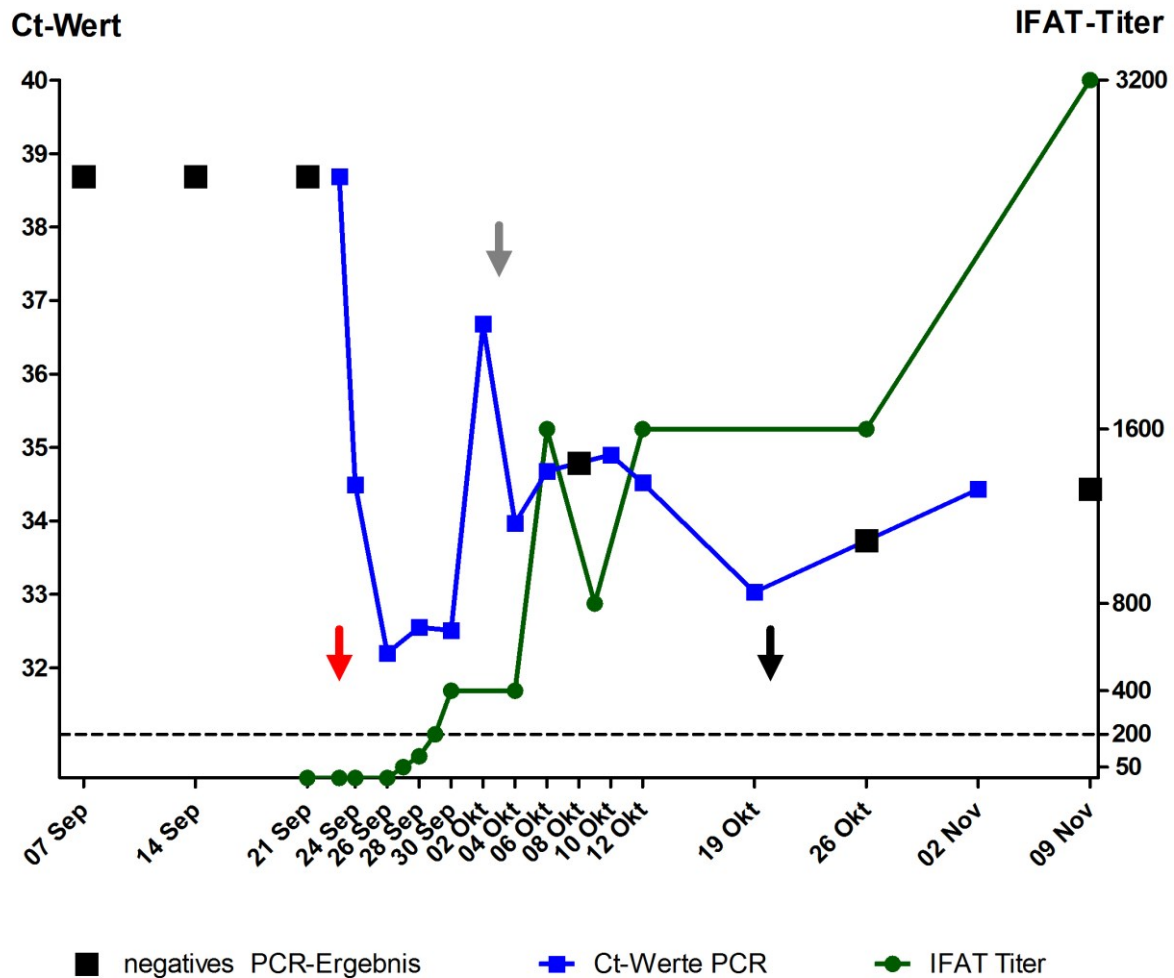


Abbildung IV-3: VT4, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich. Der rote Pfeil markiert den Beginn der Fieberphase. Der graue Pfeil markiert den histologischen Nachweis der ersten Zyste. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Nachweis erster Zysten in der skleralen Konjunktiva. Die gestrichelte Linie markiert den reziproken IFAT-Cut-off-Titer von 200.

1.1.3 Histologie

Vor Beginn der Fieberphase konnte in allen Hautanschnitten eine geringgradige, überwiegend perivaskuläre Infiltration durch einzelne eosinophile Granulozyten, einzelne Lymphozyten und Plasmazellen sowie einzelne Mastzellen festgestellt werden. Immunhistochemisch konnten vor der Temperaturerhöhung in der Haut keine Parasitenstadien nachgewiesen werden.

Tag 1: Am ersten Tag der Temperaturerhöhung zeigten sich histologisch keine zusätzlichen Zellinfiltrationen in der Haut oder Ödem. Immunhistochemisch konnte jedoch erstmals ein

Tachyzoit in einer parasitophoren Vakuole nachgewiesen werden, die sich in der Wand eines dermalen Gefäßes befand.

Tag 2: Histologisch vorherrschend war ein diffuses dermales Ödem, ohne Zunahme der Zellinfiltrationen. Immunhistochemisch konnten zwei intraendotheliale Tachyzoiten einzeln in jeweils einer parasitophoren Vakuole detektiert werden.

Tag 4, 6 und 8: Mittel- bis hochgradige überwiegend perivaskuläre, teilweise aber auch diffuse dermale Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten und Plasmazellen sowie einzelnen Makrophagen und eosinophilen Granulozyten. Des Weiteren bestand ein diffuses dermales Ödem (siehe **Abbildung IV-4**). Immunhistochemisch konnten bis zu drei Tachyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole nachgewiesen werden.

Tachyzoiten waren überwiegend oberflächlich dermal, intraendothelial lokalisiert. Vereinzelt wurden Tachyzoiten auch intra- und perivaskulär (Tag 8) nachgewiesen.



Abbildung IV-4: VT4, akutes Stadium (Tag 8): Ausgeprägtes, diffuses, subepidermales Ödem, deutlich erkennbar am auseinanderweichen der Kollagenfasern. GMA/MMA, HE.

Tag 10: Mittel- bis hochgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen sowie dermales Ödem.

Immunhistochemisch wurde in der Tiefe der Dermis eine hypertrophierte Zelle (Wirtszelle)

mit zwei großen Zellkernen und diffusem, zytoplasmatischen, positiven Signal mit umgebender blass-bläulichen Schicht nachgewiesen (siehe dazu auch **Abbildung IV-14**, S. 96). Innerhalb der intrazytoplasmatischen parasitophoren Vakuole befand sich ein Bradyzoit.

Tag 12: Nachweis der ersten Zyste in der Routinefärbung, bestehend aus einer hypertrophierten Wirtszelle mit zwei Zellkernen und deutlichen Nukleoli, umgeben von einer grünlichen Schicht. Daneben hochgradige diffuse, dermale Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sowie dermales Ödem. Immunhistochemisch konnten intraendothelial gelegene Tachyzoiten nachgewiesen werden.

Tag 14: Mittelgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen unter bevorzugter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Das Ödem wurde geringer. Es konnten keine Parasitenstadien nachgewiesen werden.

Tag 16: Mittelgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen und geringgradiges dermales Ödem. Fünf Zystenanschnitte mit hypertrophierter Wirtszelle und umgebender grünlicher Schicht, bis zu zwei große Zellkernanschnitte mit zahlreichen Nukleoli sowie parasitophorer Vakuole mit mehreren Bradyzoiten.

Tag 18: Bis zu acht Zystenanschnitte, mit bis zu acht Zellkernanschnitten und < 25 Bradyzoitenanschnitten in einer parasitophoren Vakuole. Die Zysten waren umgeben von einer grünlichen Schicht und lagen im perivaskulären Gewebe. Außerhalb der grünlichen Schicht (innere Zystenwand) bildete sich eine weitere, dünne, hyaline, elfenbeinfarbene Schicht (äußere Zystenwand) aus. Daneben fanden sich mittelgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen, ferner ein geringgradiges ungleichmäßiges dermales Ödem.

Tag 20: Fokale mittelgradige Zellinfiltrationen sowie dilatierte Lymphgefäße, jedoch kein dermales Ödem. Bis zu drei Zystenanschnitte mit bis zu acht Zellkernanschnitten, zahlreichen Nukleoli und einer parasitophoren Vakuole mit > 50 Bradyzoitenanschnitten. Die Zweischichtung der Zystenwand war nicht in allen Fällen eindeutig erkennbar. Abschnittsweise war die grünliche Schicht ungleichmäßig verdickt bis zum Dreifachen der sonstigen Schichtdicken. In der Subkutis wurde die erste Zyste innerhalb der Gefäßmedia nachgewiesen.

Tag 23: Ungleichmäßige, perivaskuläre, mittel- bis hochgradige Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und einzelnen eosinophilen Granulozyten. Sechs Zystenanschnitte mit bis zu sechs Zellkernanschnitten und zahlreichen

Nukleoli. Die grünliche Schicht war ca. zwei- bis dreimal so dick wie die äußere hyaline Schicht. Eine Zyste besaß keine grünliche Schicht und war nur von einer dünnen hyalinen Schicht umgeben. Zwei Zysten waren umgeben von einer hochgradigen, perizystischen, granulomatösen und lymphoplasmazellulären, entzündlichen Zellinfiltration.

Tag 27 und 30: Ungleichmäßige perivaskuläre sowie perizystische, mittel- bis hochgradige entzündliche Zellinfiltration unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und einzelnen eosinophilen Granulozyten. Das Zytoplasma der Makrophagen war in Richtung der Zysten, mit zystenfernen Zellkernen, ausgerichtet. Bis zu sechs Zellkernanschnitte pro Zyste sowie zahlreiche Nukleoli waren nachweisbar. Die parasitophore Vakuole mit > 50 Bradyzoiten nahm ca. ein Drittel des Wirtszellzytoplasmas ein. Die innere Zystenwand war nach wie vor dicker als die hyaline, äußere Zystenwand.

Tag 34: Drei Zysten mit hochgradiger perizystischer granulomatöser, lymphoplasmazellulärer und geringgradig eosinophil-granulozytärer entzündlicher Infiltration. In der Routinefärbung und in der Immunhistochemie konnte eine Zerstörung der Zysten beobachtet werden: Wirtszellzytoplasma, parasitophore Vakuole und Bradyzoiten konnten nicht mehr identifiziert werden, die hyaline Schicht war jedoch noch vorhanden. Innerhalb der hyalinen Schicht fand sich eine Infiltration mit zahlreichen Makrophagen. Immunhistochemisch konnten in den zerstörten Zysten – innerhalb der hyalinen Schicht – zahlreiche, granuläre Signale nachgewiesen werden (Parasitentrümmern), die sich teilweise auch in Makrophagen befanden. Ein eindeutiges Signal, das eine typische Bradyzoiten-Morphologie aufwies, war nicht mehr vorhanden.

Tag 37: Es konnten keine Gewebezysten nachgewiesen werden.

Tag 41: Zwei Zystenanschnitte ohne erkennbare Zellkernanschnitte oder parasitophore Vakuole, mit perizystischer hochgradiger granulomatöser entzündlicher Reaktion unter weiterer Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Eine der zwei Zysten war eindeutig zerstört mit nahezu vollständiger Auflösung der intrazystischen Strukturen und der hyalinen Schicht. Daneben fand sich noch ein einzelner granulomatöser Herd mit Anschnitten der hyalinen Schicht im Zentrum.

Tag 44 und 48: An diesen Tagen konnten insgesamt nur ein intakter Zystenanschnitt (Tag 44) gefunden werden. Die hochgradigen perizystischen Zellinfiltrationen setzten sich aus mehrkernigen Riesenzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen

Granulozyten zusammen. Daneben fanden sich multiple granulomatöse Herde in Dermis und Subkutis. Intakte Zysten zeigten eine parasitophore Vakuole, die bis zu zwei Dritteln des Wirtszellzytoplasmas ausmachte, jedoch nur wenige Bradyzoiten enthielt.

Tag 84 und 177: Es wurden in Dermis oder Subkutis keine weiteren Zysten mehr aufgefunden.

Immunhistochemisch konnten ab Tag 14 keine extrazystischen Signale mehr detektiert werden.

1.2 Versuchstier 6

Das weibliche Fleckviehrind VT6 war zu Beginn des Versuchs 19 Monate alt (*13.01.2008), nicht tragend, klinisch unauffällig, von gutem Ernährungszustand und serologisch negativ für Antikörper gegen *B. besnoiti*.

1.2.1 Klinik

Dieses Tier zeigte am 15.09.2009 eine Erhöhung der Körpertemperatur auf 39,9 °C.

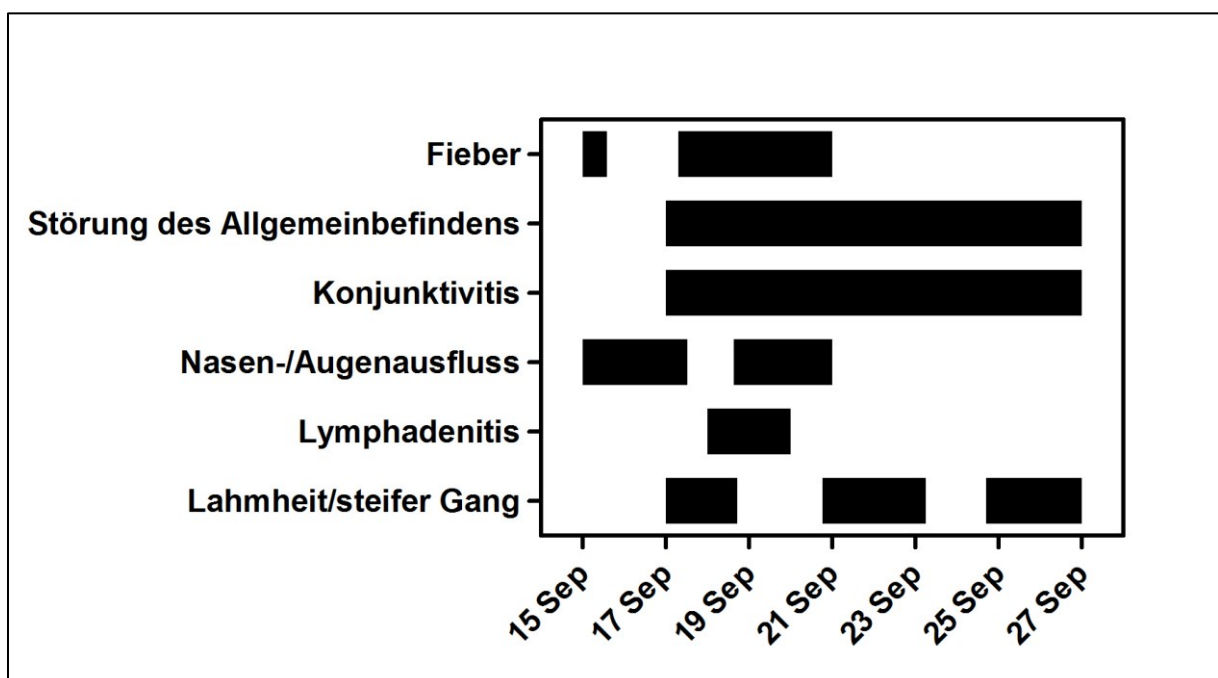


Abbildung IV-5: VT6, akutes Stadium: Übersicht der klinischen Symptome. Eine „prodromale“ Temperaturerhöhung fand vor Beginn der eigentlichen Fieberphase statt.

In den darauffolgenden zwei Tagen sank die Temperatur auf 39,3 °C, stieg dann aber für weitere vier Tage auf über 39,5 °C mit einem Temperaturmaximum 18.09.2009 von 40,3 °C (siehe **Abbildung IV-6**). Über neun Tage hinweg, war das Allgemeinbefinden reduziert und VT6 wirkte niedergeschlagen. Anzeichen einer akuten Konjunktivitis konnten über zehn Tage hinweg beobachtet werden. Nasen- und/oder Augenausfluss wurde an sechs Tagen beobachtet. Bei diesem Tier nahm der Füllungszustand des Pansens für vier Tage geringfügig ab. Während der Fieberphase konnte für drei Tage eine Vergrößerung der peripheren Lymphknoten festgestellt werden. Über elf Tage zeigte VT6 geringgradige Lahmheit (siehe **Abbildung IV-5**, S. 81). Es konnten bei diesem Tier gleichermaßen keine Hautödeme oder Veränderungen der Herz- und Atemfrequenz festgestellt werden.

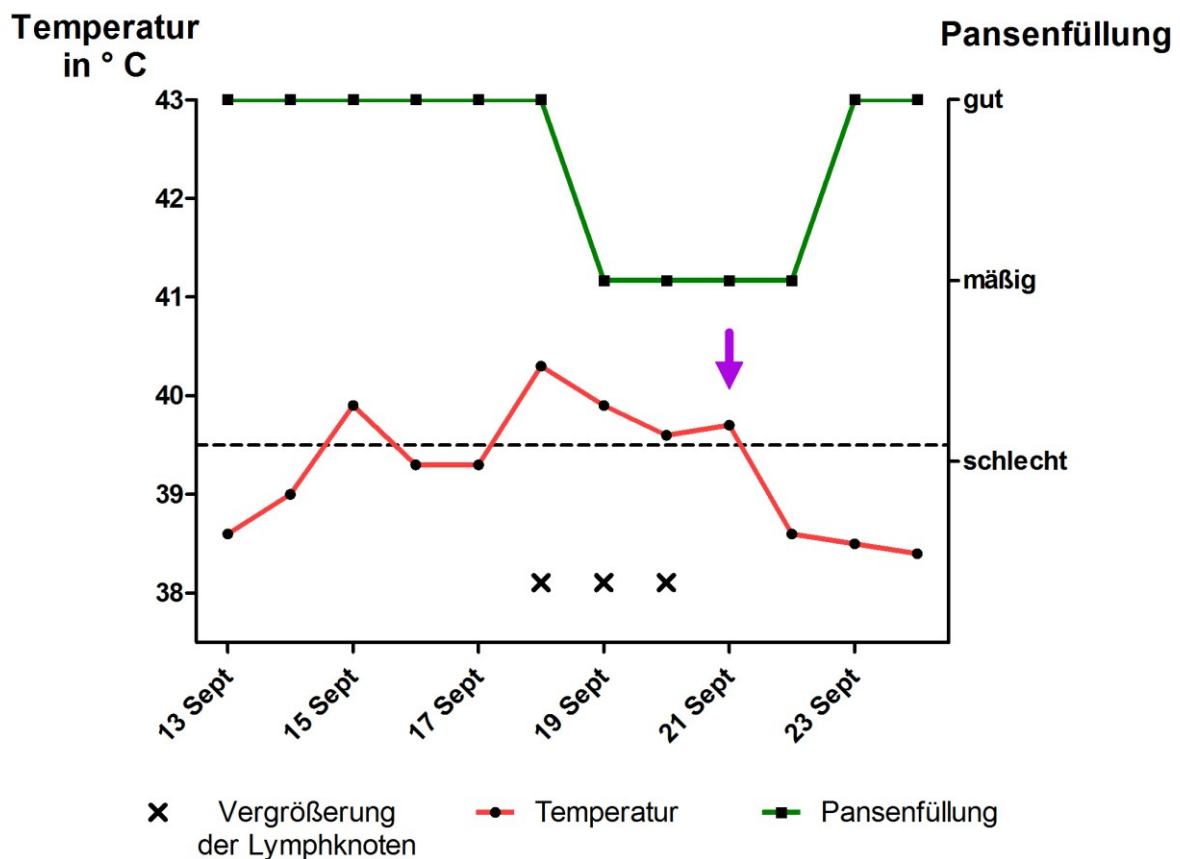


Abbildung IV-6: VT6, akutes Stadium: Rektaltemperatur und Pansenfüllung. An drei Tagen waren die peripheren Lymphknoten geringgradig vergrößert. Drei Tage vor der eigentlichen Fieberphase findet sich eine eintägige, „prodromale“ Temperaturerhöhung. Der magentafarbene Pfeil markiert das Datum der Serokonversion. Die gestrichelte Linie markiert die Cut-off-Temperatur von 39,5 °C.

Am 23.10.2009, fünfeinhalb Wochen nach Auftreten der ersten Symptome konnten in der skleralen Konjunktiva winzige, weißliche Herde festgestellt werden, die ersten makroskopisch erkennbaren Zysten. Ihre Anzahl befand sich zwischen eins und fünf (Kategorie 1) und zwei Tage später zwischen sechs und zehn (Kategorie 2). In den nachfolgenden Tagen und Woche wurden die Zysten größer und konnten so immer leichter identifiziert werden. Zysten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* konnten erst sehr viel später – am 03.02.2010 – nachgewiesen werden. Auch hier stellten sie sich als kleine, weißlich Herde dar, deren Anzahl zwischen eins und fünf (Kategorie 1) lag.

Das Tier zeigte bis auf die makroskopisch nachweisbaren Zysten keine typischen Hautveränderungen der chronischen Besnoitiose. Ein negativer Einfluss der Krankheit auf den BCS wurde bei diesem Tier weder im akuten noch im chronischen Stadium festgestellt.

1.2.2 PCR und Serologie

Der erste Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut erfolgte am dritten Tag nach der ersten Temperaturerhöhung, mit Beginn der eigentlichen Fieberphase. In den Proben von drei vorangegangenen Entnahmezeitpunkten, die über einen Zeitraum von 15 Tagen verteilt waren, sowie am Tag der ersten Temperaturerhöhung wurde keine DNA nachgewiesen.

Bis zum Zeitpunkt der Serokonversion nahm die nachgewiesene DNA-Menge kontinuierlich zu und zeigte danach einen deutlichen Abfall. Nach einer ca. einwöchigen Plateauphase konnte bis zum Ende des Versuchs ein kontinuierlicher Anstieg der Parasiten-DNA nachgewiesen werden (siehe **Abbildung IV-7**, S. 84).

Am 21.09.2009, drei Tage nach Beginn der Fieberphase, konnten im Bradyzoiten-Blot sechs und im Tachyzoiten-Blot vier spezifische Banden nachgewiesen werden.

Der reziproke IFAT-Titer erreichte am selben Tag den Cut-Off von 200, das Tier wurde als seropositiv eingestuft. Bis zum Ende des Versuchs stieg der reziproke IFAT-Titer stetig an bis zu einem Maximum von 3200 (siehe **Abbildung IV-7**, S. 84).

Am 15.12.2009 konnte in beiden untersuchten Proben nach wie vor Parasiten-DNA nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Abnahme der DNA-Menge von den Ct-Werten 23,75 (15.12.2009) auf 34,8 (18.03.2010).

Der reziproke IFAT-Titer nahm ab von 3200 am 09.11.2009 auf 1600 im Dezember und stieg dann im März 2010 wieder auf 3200 an.

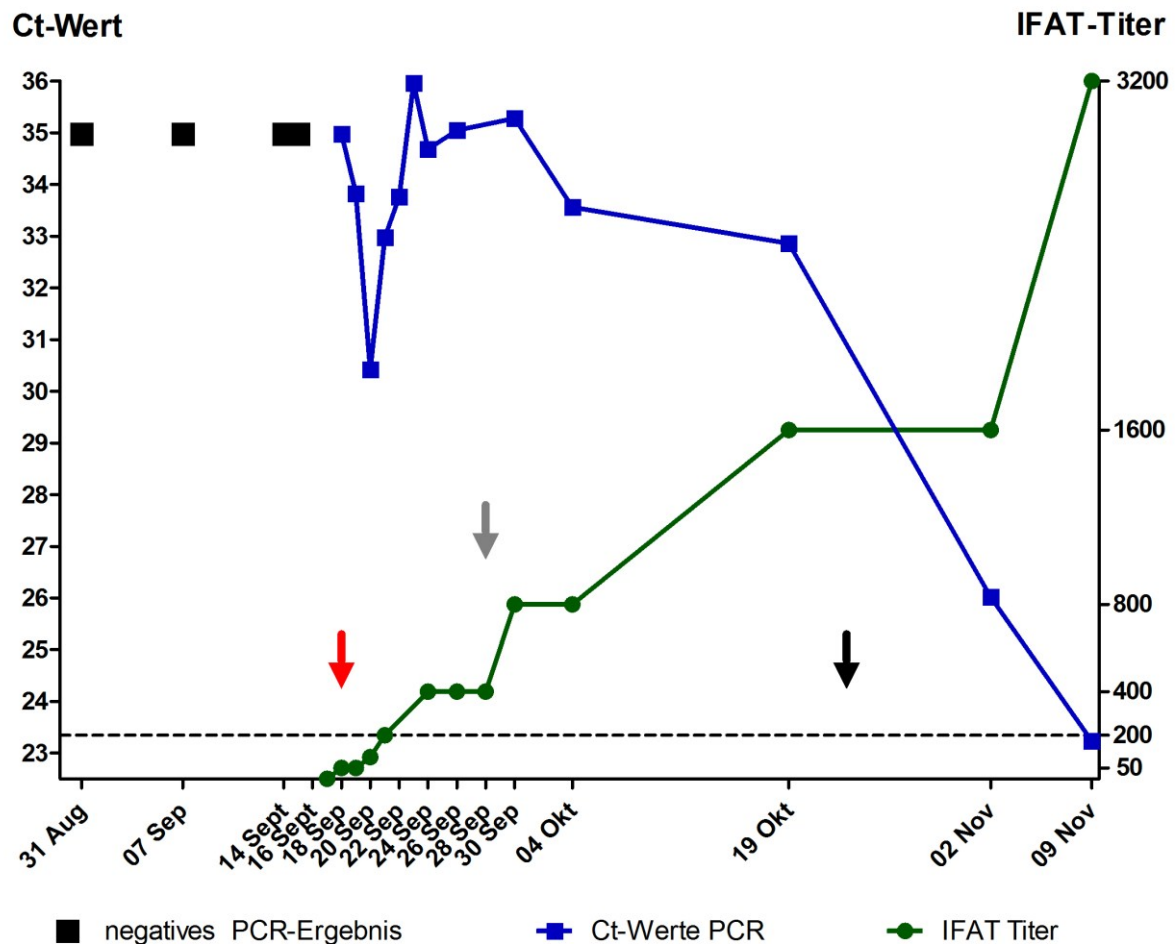


Abbildung IV-7: VT6, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich. Der rote Pfeil markiert den Beginn der Fieberphase. Der graue Pfeil markiert den histologischen Nachweis der ersten Zyste. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Nachweis erster Zysten in der skleralen Konjunktiva. Die gestrichelte Linie markiert den reziproken IFAT-Cut-off-Titer von 200.

1.2.3 Histologie

Vor Beginn der Fieberphase konnte in allen Hautschnitten eine geringgradige, überwiegend perivaskuläre Infiltration von einzelnen eosinophilen Granulozyten, einzelnen Lymphozyten und Plasmazellen sowie einzelnen Mastzellen festgestellt werden. Immunhistochemisch konnten vor der Temperaturerhöhung in der Haut keine Parasitenstadien nachgewiesen werden.

Am Tag der ersten Temperaturerhöhung konnten außer den oben aufgeführten Befunden keine weiteren Besonderheiten festgestellt werden.

Tag 1: Am Beginn der mehrtägigen Fieberphase fand sich keine eindeutige Zunahme der Zellinfiltrationen oder Ödematisierung der Haut. Immunhistochemisch konnten jedoch in einer Lokalisation intraendothelial vier Tachyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole nachgewiesen werden.

Tag 2 - 4: Bis mittelgradige Zellinfiltrationen in der Umgebung von Gefäßen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, einzelnen Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sowie ungleichmäßig ausgeprägtes dermales Ödem. Immunhistochemisch konnten in mehreren Lokalisationen Tachyzoiten mit umgebender parasitophoren Vakuole dargestellt werden. Tachyzoiten lagen überwiegend einzeln, stellenweise aber auch in Gruppen von bis zu vier Stück innerhalb einer parasitophoren Vakuole.

Tag 5: Mittel- bis hochgradige, perivaskuläre, multifokal ausgedehnte entzündliche Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, ferner diffuses dermales Ödem. Immunhistochemisch konnten zahlreiche intraendothelial gelegene Tachyzoiten, überwiegend einzeln, in einer Lokalisation bis zu fünf, innerhalb einer parasitophoren Vakuole nachgewiesen werden.

Tag 6 und 7: Mittelgradige, perivaskuläre, entzündliche Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sowie ungleichmäßiges dermales Ödem. Immunhistochemisch konnten einzelne Endozoiten intraendothelial und perivaskulär festgestellt werden.

Tag 9: Mittelgradige, perivaskuläre, entzündliche Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sowie ungleichmäßiges dermales Ödem. In der Immunhistochemie wurde die erste junge Zyste nachgewiesen, bestehend aus einer hypertrophieren Wirtszelle mit zwei großen Zellkernen und diffusem, schwachen, zytoplasmatischen Signal. Die Zyste war umgeben von einer dünnen, violetten Schicht (innere Zystenwand). Innerhalb der Zyste waren keine Bradyzoitenanschnitte festzustellen. In der Tiefe fanden sich in einer Lokalisation einzelne Tachyzoiten, intraendothelial, bis zu drei Stück innerhalb einer parasitophoren Vakuole.

Tag 11: Mittel- bis hochgradige, überwiegend perivaskuläre, entzündliche Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen und ungleichmäßiges dermales Ödem. In der Immunhistochemie wurde eine direkt unter der Epidermis gelegene, junge Zyste nachgewiesen. Mit hypertrophierter

Wirtszelle, zwei großen Zellkernen mit zahlreichen Nukleoli und einer parasitophoren Vakuole mit darin befindlichen einzelnen Bradyzoitenanschnitten. Umgeben war die Zyste von einer violetten, in der Peripherie ausgefranst wirkenden Schicht (innere Zystenwand).

Tag 13: Zwei junge Zysten waren in der Dermis nachweisbar, bestehend aus einer hypertrophierten Wirtszelle umgeben von einer grünlichen Schicht (innere Zystenwand). Im Wirtszellzytoplasma befanden sich bis zu zwei große Zellkerne und es konnte kein Anschnitt einer parasitophoren Vakuole identifiziert werden (siehe **Abbildung IV-8**).

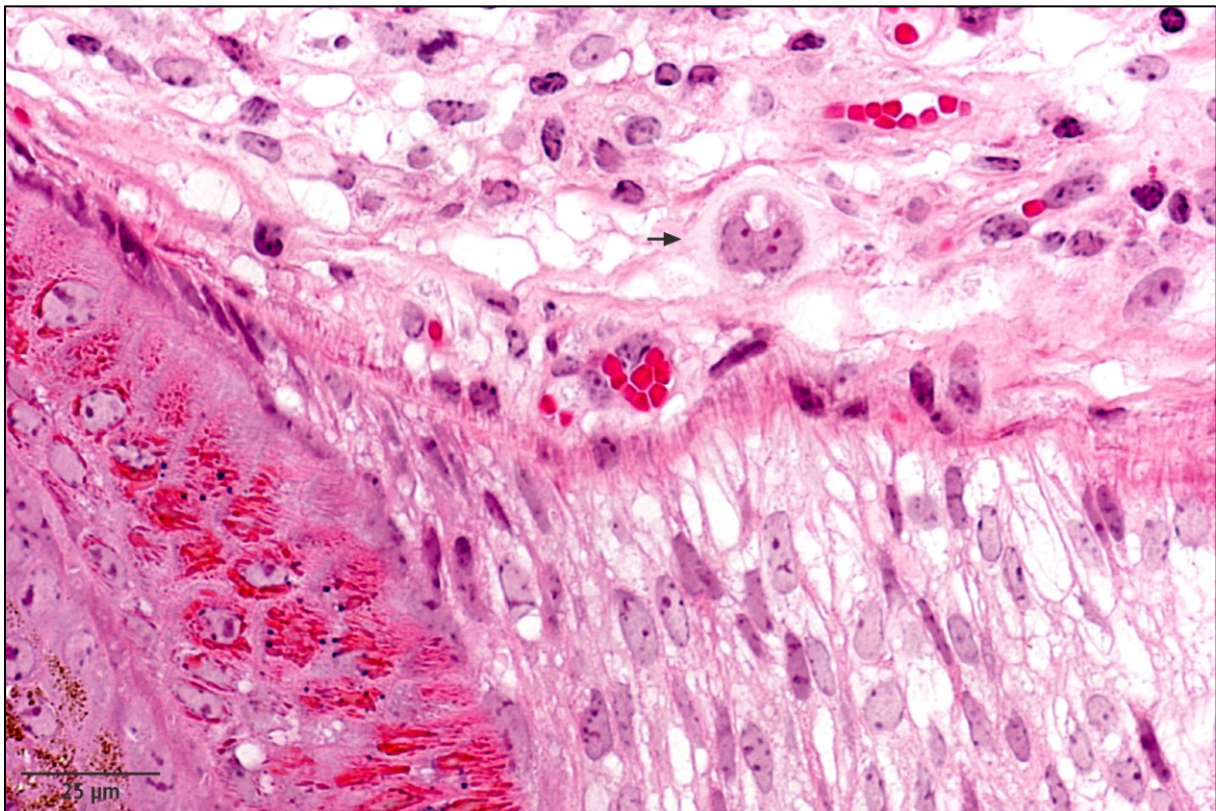


Abbildung IV-8: VT6, (Tag 13): Sehr junge Zyste in der Dermis bestehend aus einer hypertrophierten Wirtszelle mit zwei Zellkernen umgeben von einer grünlichen Schicht (Pfeil). GMA/MMA, HE.

Tag 15: Diffuses dermales Ödem und eine in der Tiefe befindliche, kleine Zyste mit einem großen Zellkern, umgeben von einer grünlichen Schicht. In der Immunhistochemie konnte oberflächlich dermal eine weitere Zyste nachgewiesen werden mit einer parasitophoren Vakuole und drei darin befindlichen Bradyzoiten.

Tag 17: Kein Nachweis von Parasitenstadien.

Tag 19: Multifokale, perivaskuläre und periadnexale Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. Es gelang der Nachweis von

zwei Zystenanschnitten, mit hypertrophierter Wirtszelle, bis zu vier großen Zellkernanschnitten und umgebender grünlicher Schicht (innere Zystenwand). Parasitophore Vakuolen wurden nicht angeschnitten.

Tag 21: In der Immunhistochemie wurde ein Zystenanschnitt mit parasitophorer Vakuole und darin befindlichen 13 Bradyzoitenanschnitten beobachtet. Die Zyste bestand aus einer immer größer werdenden hypertrophierten Wirtszelle und war umgeben von einer violetten Schicht. Die parasitophore Vakuole nahm ca. ein Drittel des Wirtszellzytoplasmas ein.

Tag 25: Acht Zystenanschnitte, fünf davon subepidermal in eine Gruppe zusammenliegend. Die Wirtszellen hatten sich weiter vergrößert und beinhalteten bis zu 13 Zellkerne, die teilweise stark gelappt waren und multiple Nukleoli besaßen. Die parasitophore Vakuole mit bis zu ca. 100 Bradyzoiten nahm bis zur Hälfte des Wirtszellzytoplasmas ein (siehe **Abbildung IV-51**, S. 139). Zysten waren umgeben von einer deutlichen grünlichen Schicht (innere Zystenwand) und einer äußeren, dünnen, hyalinen Schicht (äußere Zystenwand). In der Immunhistochemie konnten zwei Zystenanschnitte nachgewiesen werden, eine Zyste mit einem diffusen zytoplasmatischen Signal.

Tag 28 und 32: Drei (Tag 28) und fünf (Tag 32) Zystenanschnitte, mit großer Wirtszelle und bis zu zehn hypertrophierten Zellkernen. Die parasitophore Vakuole nahm bis zur Hälfte des Wirtszellzytoplasmas ein und enthielt ca. 100 Bradyzoitenanschnitte. Umgeben waren die Zysten von einer nach wie vor prominenteren grünlichen Schicht und einer dünneren, äußeren hyalinen Schicht.

Tag 35: Immunhistochemisch konnte eine große Zyste nachgewiesen werden mit hypertrophierten Zellkernen und einer parasitophoren Vakuole mit ca. 50 Bradyzoiten.

Tag 39 und 42: Sechs und 16 Zystenanschnitte mit großen parasitophoren Vakuolen, die nahezu das gesamte Wirtszellzytoplasma einnahmen und sehr zahlreiche Parasiten enthielten. Die Wirtszellkerne waren in die Peripherie verschoben. Die Zysten waren umgeben von einer grünlichen inneren Schicht und einer dicken, hyalinen, äußeren Schicht. Gering- bis mittelgradige perizystische Zellinfiltrationen konnten erstmals nachgewiesen werden, unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Fokal fanden sich auch mittelgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten,

Lymphozyten und Plasmazellen. Immunhistochemisch positiv reagierten Bradyzoiten, parasitophore Vakuolen und Wirtszellzytoplasma.

Tag 46 und 49: An diesen beiden Tagen konnten 14 beziehungsweise ein Zystenanschnitt(e) nachgewiesen werden. Der überwiegende Teil der Zysten enthielt eine parasitophore Vakuole, die nahezu das gesamte Zystenlumen ausmachte und die Strukturen der Wirtszelle in die Peripherie drückte (reife Zysten). Manche Zysten waren umgeben von einer gering- bis mittelgradigen entzündlichen Zellinfiltration, andere lagen dagegen reaktionslos im Gewebe. Um einzelne Zysten befanden sich zirkulär angeordnete, spindelförmige Zellen.

Tag 53: Sieben Zystenanschnitte reifer Zysten mit umgebender mittel- bis hochgradiger entzündlichen Zellinfiltration unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. In der Immunhistochemie konnte erstmals die Invasion des Zystenlumens mit Makrophagen und Granulozyten nachgewiesen werden. Innerhalb dieses Infiltrats fanden sich noch kleine, granuläre, positive Signale (Parasitentrümmer).

Tag 89: Drei Zystenanschnitte mit umgebender hochgradiger entzündlicher Zellinfiltration unter Beteiligung von oben genannten Zellen. Eine zerstörte Zyste mit histiozytärer und granulozytärer Infiltration des Zystenlumens.

Tag 182: Es konnten keine weiteren Parasitenstadien nachgewiesen werden.

Immunhistochemisch konnten ab Tag 9 keine extrazystischen Signale mehr detektiert werden.

1.3 Versuchstier 8

Das weibliche Fleckviehrind VT8 war zu Beginn des Versuchs 13 Monate alt (*13.07.2008), nicht tragend, klinisch unauffällig, von gutem Ernährungszustand und serologisch negativ für Antikörper gegen *B. besnoiti*.

1.3.1 Klinik

Bei diesem Tier konnten keinerlei klinische Auffälligkeiten beobachtet werden. Das Tier war aufmerksam und zeigte ungestörtes Allgemeinbefinden. Rektaltemperatur, Futteraufnahme, Farbe der Schleimhäute, Episkleralgefäße und das Gangbild waren ohne besonderen Befund.

Herz- und Atemfrequenz befanden sich im physiologischen Bereich. Es konnten weder Lymphknotenschwellungen oder Ödeme in der Unterhaut, noch Zysten in den Schleimhäuten festgestellt werden. Das Tier zeigte keinen Verlust an Körpermasse.

1.3.2 Serologie und PCR

Am 29.10.2009 wurden bei der routinemäßigen Serumuntersuchung im Immunoblot sechs Bradyzoiten- und vier Tachyzoiten-Banden festgestellt, der reziproke IFAT-Titer lag bei 800. Das Tier wurde somit als seropositiv eingestuft. Drei Tage zuvor wurde in beiden Blots die Grenze von vier Banden nicht erreicht und der reziproke IFAT-Titer lag mit 50 unter dem Cut-Off Titer von 200. Bis zum 09.11.2009 wurden bei allen Untersuchungen mindestens vier Banden in beiden Blots detektiert und der reziproke IFAT-Titer überstieg 800 nicht.

Drei Tage vor Serokonversion konnten geringe Mengen Parasiten-DNA in der Haut nachgewiesen werden (Ct 39,08). Im Dezember 2009 wurde erneut Parasiten-DNA in der Haut nachgewiesen, die Ct-Werte lagen hierbei wesentlich niedriger (27,42). Im März lag der Ct-Wert bei 40,3 und damit nicht innerhalb des als positiv definierten Bereichs.

Der reziproke IFAT-Titer stieg von 800 zum Ende des Versuchs auf 1600 im Dezember und fiel im März wieder auf 800 ab.

1.3.3 Histologie

Histologisch konnten in der Haut weder in den Routinefärbungen noch mittels Immunhistochemie Parasitenstadien nachgewiesen werden. Die Haut zeigte während des gesamten Versuchszeitraums bis auf größtenteils geringgradige perivaskuläre lymphoplasmazelluläre und eosinophil-granulozytäre Infiltrate sowie tageweise ein geringgradiges diffuses Ödem keine weiteren Läsionen. Um den errechneten Zeitpunkt des akuten Stadiums konnten histologisch keine zusätzlichen spezifischen Veränderungen festgestellt werden.

1.4 Versuchstier 20

Das weibliche Limousinrind VT20 war bei Vorstellung vier Jahre und fünf Monate alt (*11.03.2005), nicht tragend und serologisch negativ für Antikörper gegen *B. besnoiti* und BHV-1 sowie BVDV-Antigen.

1.4.1 Klinik

Am Tag der Vorstellung zeigte VT20 eine erhöhte Körpertemperatur von 40,7 °C, erhöhte Herz- und Atemfrequenzen (108 bzw. 120 pro Minute), geringgradige Lahmheit sowie hochgradigen, serösen Augenausfluss. Ein Teil dieser Parameter normalisierte sich in den darauffolgenden Tagen. Eine Veränderung des Gangbildes im Sinne einer Lahmheit konnte nach vier Tagen nicht mehr beobachtet werden. Insbesondere an den distalen Gliedmaßen konnte ein subkutanes Ödem nachgewiesen werden, das zwei Tage nach Vorstellung auftrat und für drei Tage zu beobachten war. Anzeichen für eine Konjunktivitis wurden an drei Tagen gesehen, zudem zeigte das Tier deutlichen Nasen- und/oder Augenausfluss an neun Tagen. Über fünf Tage konnte eine deutliche Vergrößerung der peripheren Lymphknoten festgestellt werden (siehe **Abbildung IV-9**).

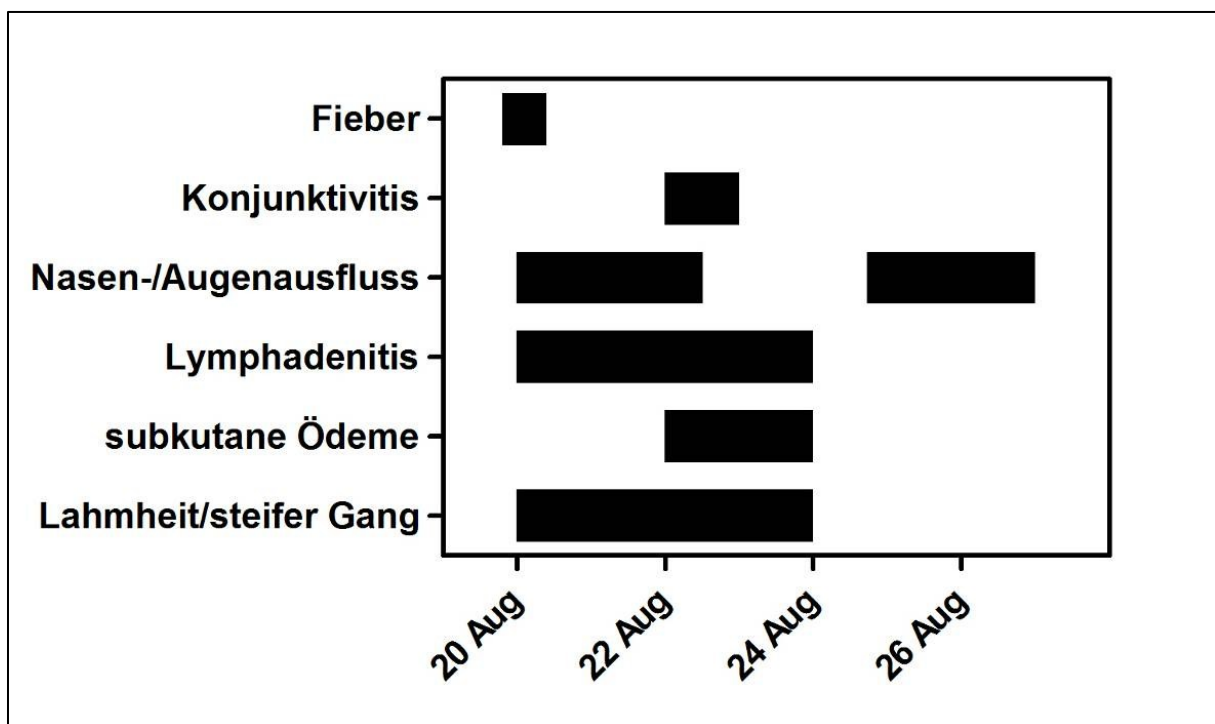


Abbildung IV-9: VT20, Akutes Stadium: Übersicht der klinischen Symptome.

Erste Hautveränderungen im Sinne einer palpierbaren Verdickung der Haut konnten bereits 23 Tage nach Vorstellung festgestellt werden. Zeitgleich wurden in der skleralen Konjunktiva einzelne, weißliche Zysten nachgewiesen, deren Anzahl zwischen eins und fünf lag (Kategorie 1). In den folgenden Tagen und Wochen erhöhte sich die Anzahl der Zysten auf >30 (Kategorie 5) und die Zysten wurden immer größer. Zysten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* wurden vier Tage nach deren Auftreten in der skleralen Konjunktiva festgestellt. Hier lag die Anzahl zwischen elf und 20 (Kategorie 3).

Die Veränderungen der Haut schritten fort, so dass bereits 37 Tage nach Vorstellung eine hochgradige Hautverdickung mit einhergehender Faltenbildung nachweisbar war. Speziell in haarlosen Hautarealen, wie beispielsweise am Euter, waren diese Veränderungen deutlich sichtbar. Zusätzlich wies dieses Tier über mehrere Wochen ein stumpf wirkendes Haarkleid auf. Trotz guter Futteraufnahme zeigte das Tier eine fortschreitende, ausgeprägte Verminderung des Ernährungszustandes sichtbar durch den Abfall des BCS von 3,0 bei Vorstellung auf 2,5 nach ca. fünf Wochen. Eine Erhöhung des BCS auf 3,0 konnte erst wieder am 15.12.2009 festgestellt werden.

Trotz wiederholter Behandlung der im chronischen Stadium aufgetretenen, tiefreichenden Klauenläsionen, in Form von komplizierten Klauengeschwüren, konnte keine Verbesserung der Klauengesundheit erreicht werden. So wurde das Tier am 07. Juni 2010 euthanasiert und im Institut für Tierpathologie seziert (siehe Abschnitt 2.1, S. 109).

1.4.2 Serologie und PCR

Bereits am Tag der Vorstellung wurde Parasiten-DNA in der Haut nachgewiesen. Ab Anfang September konnte dann eine erhebliche Zunahme der Menge an DNA in der Haut beobachtet werden (siehe **Abbildung IV-10**, S. 92).

Ein Tag nach Vorstellung wurden fünf spezifische Banden im Tachyzoiten-Blot und ein IFAT-Titer von 1:800 festgestellt. Am vorherigen Tag konnte ein IFAT-Titer von 1:800, jedoch keine Banden im Tachyzoiten- und Bradyzoiten-Blot nachgewiesen werden. Das Tier wurde als seropositiv eingestuft.

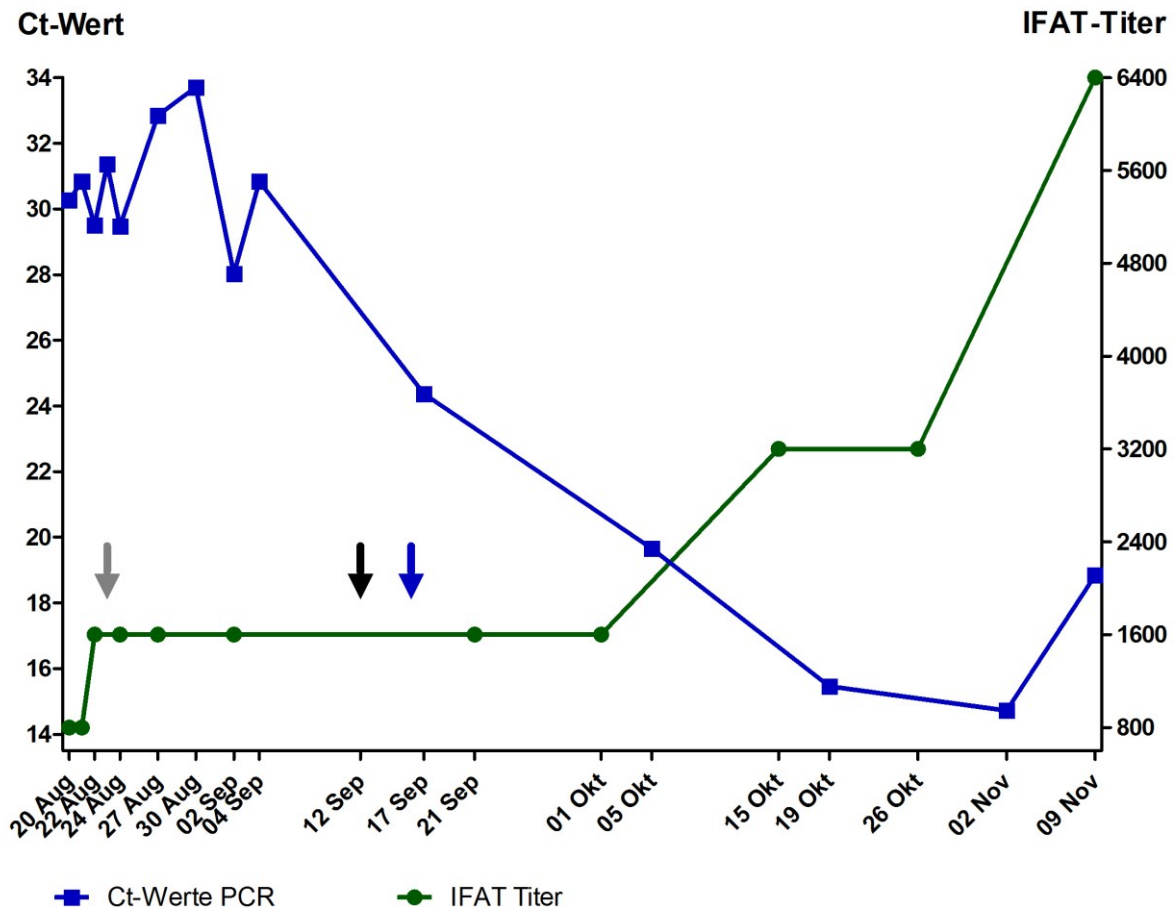


Abbildung IV-10: VT20, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich. Der graue Pfeil markiert den histologischen Nachweis der ersten Zyste. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Nachweis erster Zysten in der skleralen Konjunktiva. Der blaue Pfeil markiert den Nachweis erster Zysten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae*.

Fünf Tage nach Vorstellung und einen Tag nach dem histologischen Nachweis der ersten Zyste konnten erstmals vier spezifische Banden im Bradyzoiten-Blot nachgewiesen werden. Der reziproke IFAT-Titer stieg im Laufe des Versuchs stetig an und erreichte ein Maximum von 6400 am Ende des Versuchszeitraumes.

Am 15.12.2009 und 18.03.2009 konnte in beiden untersuchten Proben nach wie vor Parasiten-DNA nachgewiesen werden (Ct-Wert bei 14,52 beziehungsweise 17,97).

Auch bei diesem Tier konnte eine Abnahme des reziproken IFAT-Titers von 6400 im Dezember auf 3200 im März festgestellt werden.

1.4.3 Histologie

Tag 1: Am Tag der Vorstellung konnten in der Haut diffuse hochgradige entzündliche Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, und eosinophilen und neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Ferner waren diffuses dermales Ödem, Hyperämie sowie multifokale akute gering- bis mittelgradige Blutungen vorhanden. Bereits in der HE-Färbung konnten Tachyzoiten intraendothelial nachgewiesen werden (siehe **Abbildung IV-11**). Sie lagen einzeln oder in Gruppen von bis zu fünf innerhalb einer parasitophoren Vakuole.

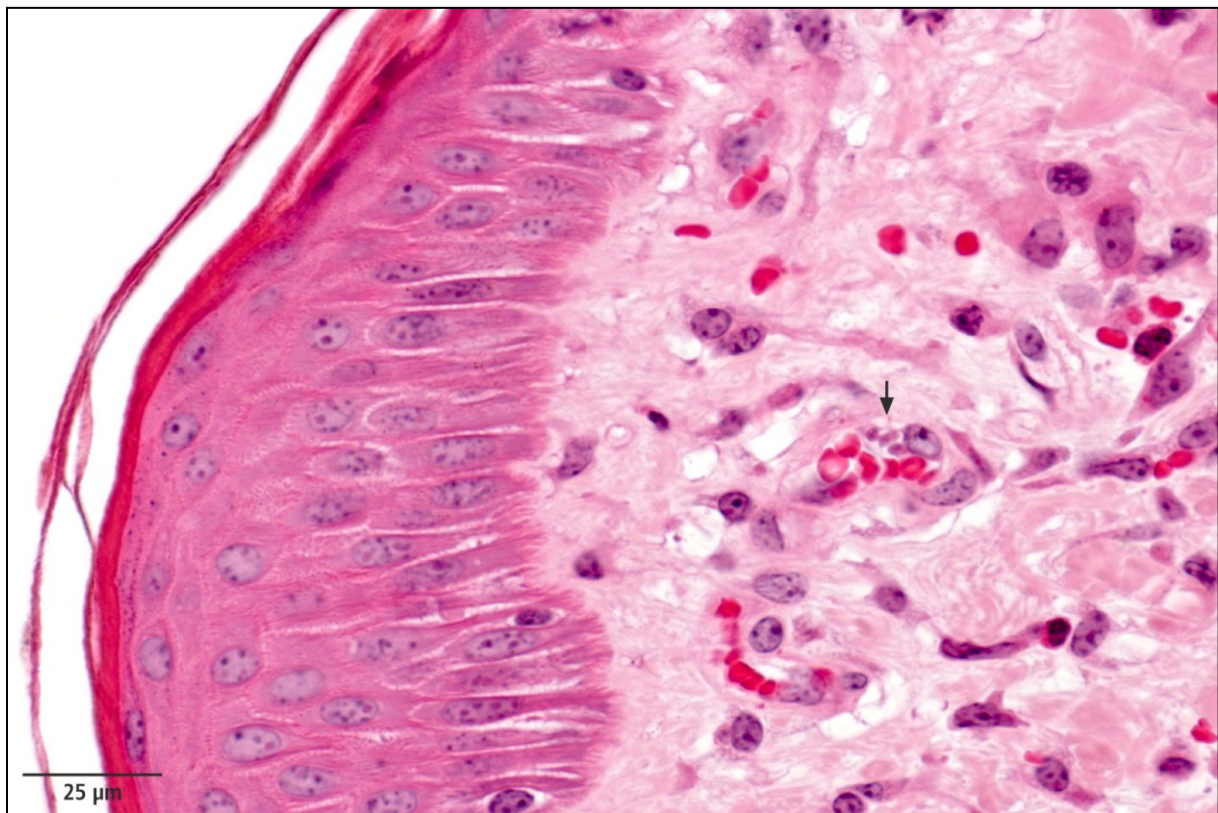


Abbildung IV-11: VT20, akutes Stadium (Tag 1): Drei intraendothelial, innerhalb einer parasitophoren Vakuole liegende Tachyzoiten (Pfeil). GMA/MMA, HE.

Immunhistochemisch konnten zahlreiche Tachyzoiten in der Dermis nachgewiesen werden, die einzeln oder in Gruppen von bis zu sieben Stück innerhalb einer parasitophoren Vakuole lagen und teilweise staudenartige Strukturen bildeten (siehe **Abbildung IV-12**, S. 94 und **Abbildung IV-13**, S. 95). Tachyzoiten-Signale konnten überwiegend intraendothelial, teilweise aber auch perivaskulär aufgefunden werden.

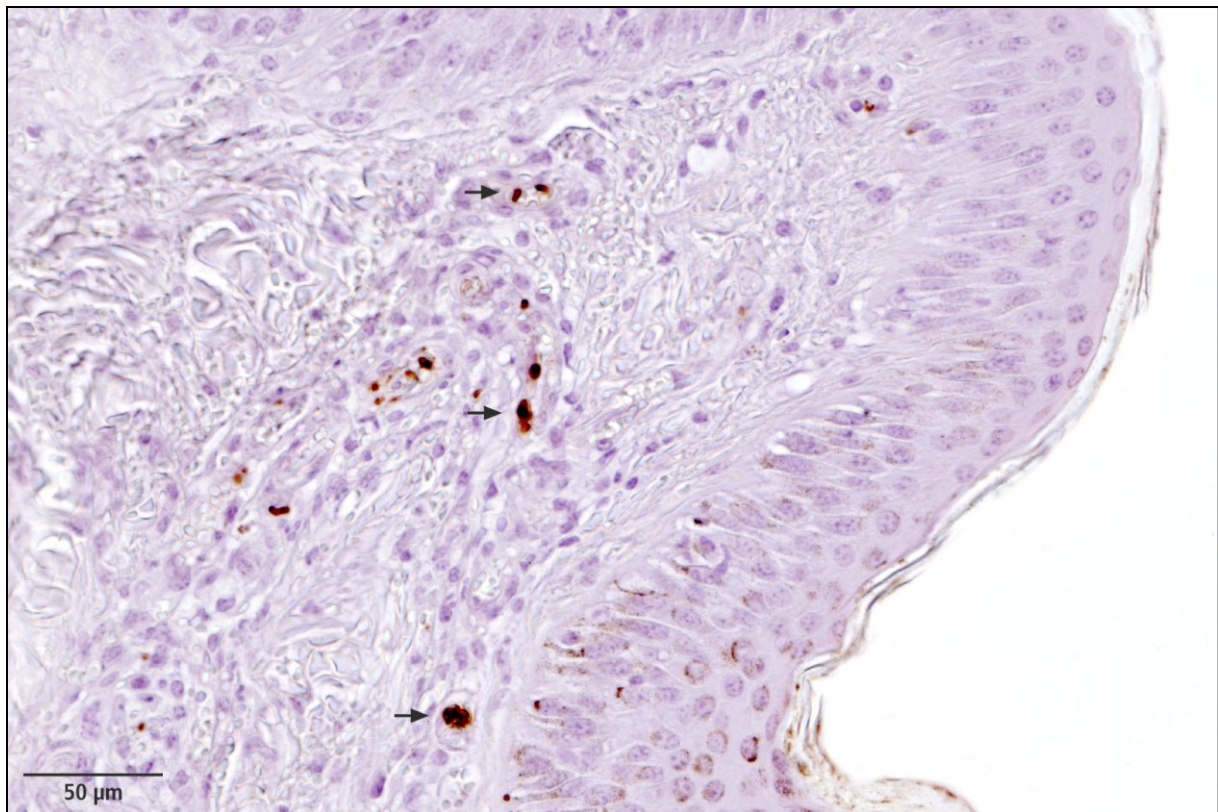


Abbildung IV-12: VT20, akutes Stadium (Tag 1): Zahlreiche positive Signale in der Dermis (Tachyzoiten, Pfeile). Ein Bezug zu Gefäßen und Gefäßumgebung ist deutlich zu erkennen. Paraffin, Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie, Hämalaun.

Tag 2: Ausgeprägtes, diffuses, dermales Ödem sowie geringgradige akute Blutungen. Daneben fanden sich multifokale, mittel- bis hochgradige, perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Immunhistochemisch wurden zahlreiche Tachyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole überwiegend einzeln, aber auch in Gruppen von bis zu vier Stück nachgewiesen. Tachyzoiten wurden sowohl intraendothelial als auch perivaskulär aufgefunden.

Tag 3: Ungleichmäßige, mittelgradige, perivaskuläre Zellinfiltrate unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und einzelnen Makrophagen sowie ausgeprägtes diffuses dermales Ödem. Immunhistochemisch wurden mehrere Tachyzoiten-Signale überwiegend einzeln und perivaskulär nachgewiesen.

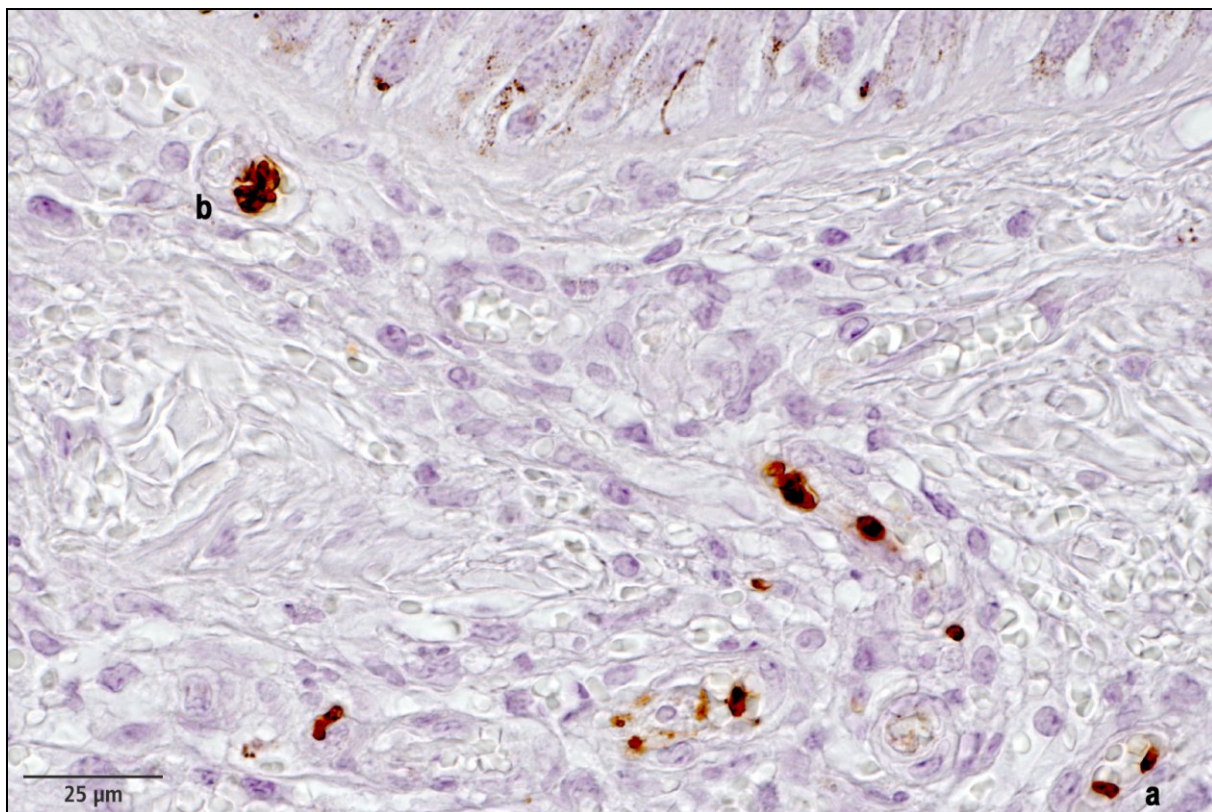


Abbildung IV-13: VT20, akutes Stadium (Tag 1): Zahlreiche intraendothelial liegende Tachyzoiten. Tachyzoiten wurden häufig einzeln (a) aber auch in Gruppen in charakteristischer staudenartiger Formation gefunden (b). Paraffin, Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie, Hämalaun.

Tag 4: Ungleichmäßige, perivaskuläre, entzündliche Zellinfiltrate unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten, ferner diffuses dermales Ödem. In der HE-Färbung konnte bereits die erste Zyste nachgewiesen werden. Diese bestand aus einer hypertrophierten Wirtszelle mit großem Kern und zahlreichen Nukleoli, eine parasitophore Vakuole wurde nicht angeschnitten. Immunhistochemisch konnten mehrere überwiegend einzelne Endozoiten vor allem perivaskulär nachgewiesen werden. In einer Lokalisation fand sich eine hypertrophierte Zelle mit zwei Zellkernen und diffusem zytoplasmatischen Signal. Eine parasitophore Vakuole war auch hier nicht angeschnitten (siehe **Abbildung IV-14**, S. 96). Diese Zelle repräsentierte eine sehr junge Zyste.

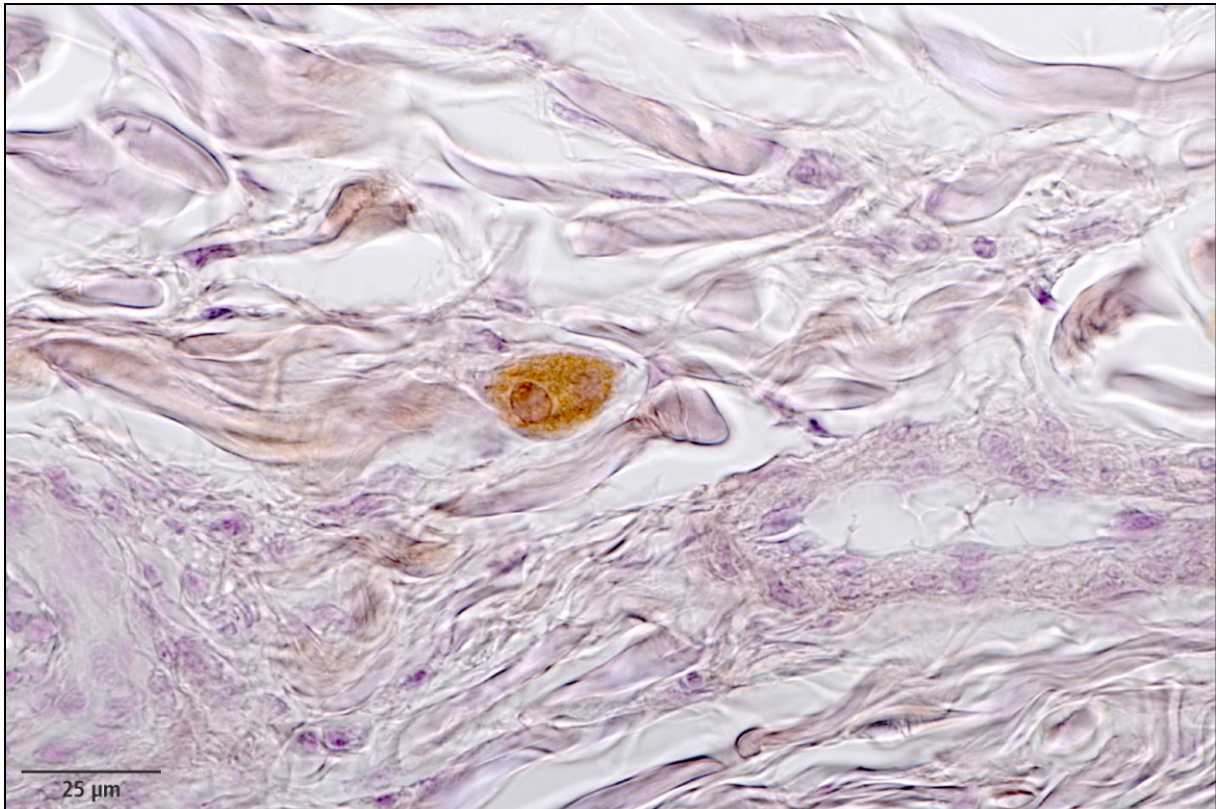


Abbildung IV-14: VT20, (Tag 4): Diffuses zytoplasmatisches Signal in einer hypertrophierten Wirtszelle mit zwei Zellkernen. Die parasitophore Vakuole ist nicht angeschnitten. Paraffin, Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie, Hämalaun.

Tag 5: Ungleichmäßige, bis hochgradige, perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Daneben bestand ein diffuses dermales Ödem. Immunhistochemisch konnten einzelne Endozoiten in Gruppen von bis zu drei Parasiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole überwiegend in der Umgebung von Gefäßen gefunden werden sowie in der *Tunica media* größerer Gefäße. In einer Lokalisation wurde eine hypertrophierte Zelle mit einem Zellkern und diffusem Signal im Zytoplasma angeschnitten.

Tag 6: Mittelgradige, perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen sowie ein diffuses dermales Ödem. Vier Anschnitte von jungen Zysten, bestehend aus einer hypertrophierten Wirtszelle mit bis zwei großen Zellkernen umgeben von einer grünlichen Schicht (siehe **Abbildung IV-15**, S.97). Immunhistochemisch wurde innerhalb einer Zyste eine parasitophore Vakuole mit zwei Bradyzoiten nachgewiesen. Daneben fanden sich einzelne extrazystische Anschnitte von parasitophoren Vakuolen in der Gefäßumgebung.

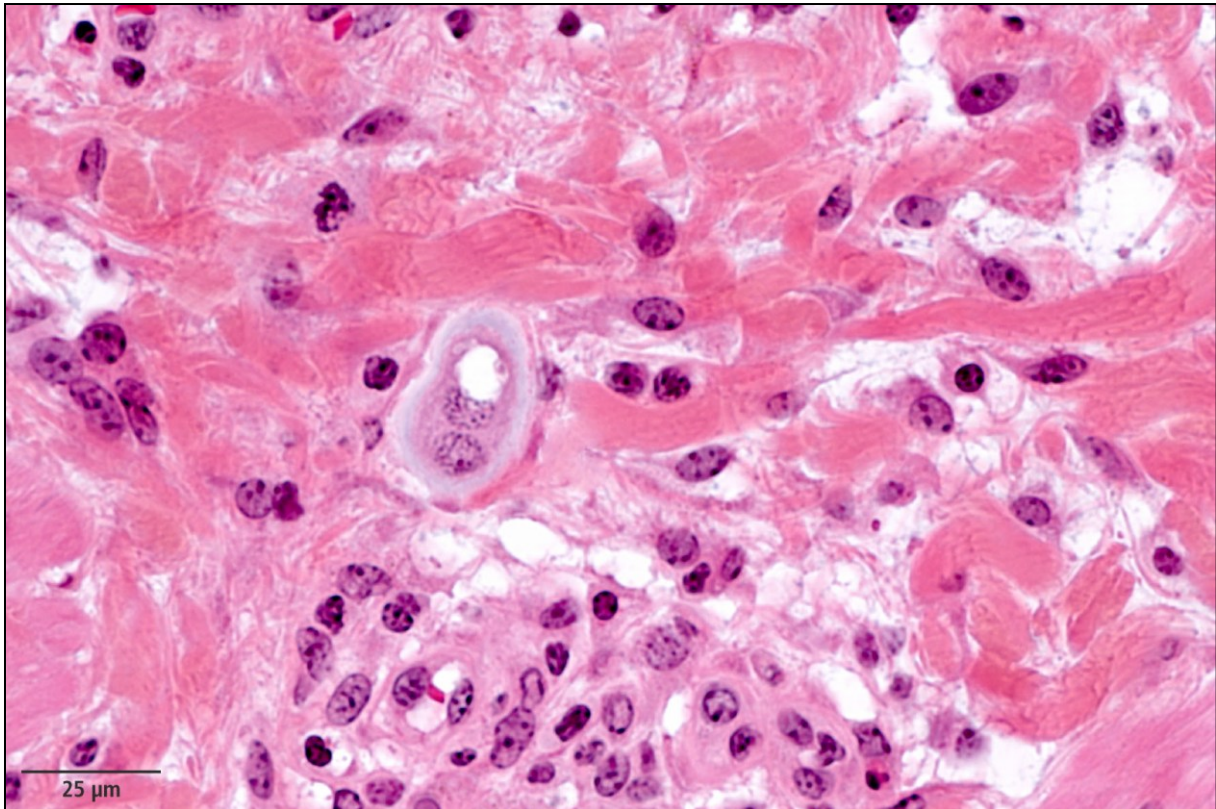


Abbildung IV-15: VT20 (Tag 6): Junge Zyste bestehend aus hypertrophierter Wirtszelle mit zwei Zellkernen und umgebender grünlicher Schicht. GMA/MMA, HE.

Tag 7: Mittel- bis hochgradige, dermale und subkutane, perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten und diffuses dermales Ödem. In der Routinefärbung wurden in der Dermis drei, in der Subkutis sieben Zystenanschnitte gefunden mit bis zu zwei Zellkernen, umgebender grünlicher Schicht und parasitophorer Vakuole sowie bis zu drei Bradyzoitenanschnitten. Eine der subkutanen Zysten befand sich in der *Tunica media* eines größeren Gefäßes.

Tag 8: Mittelgradige überwiegend perivaskuläre Zellinfiltrationen. Bis zu acht Anschnitte junger Zysten, die weiter an Größe zugenommen hatten, in Dermis und Subkutis, teilweise mit Anschnitten der parasitophoren Vakuole und wenigen darin befindlichen Bradyzoiten. Umgeben waren die Zysten von einer grünlichen Schicht.

Tag 9: Gering- bis mittelgradige, perivaskuläre, dermale und subkutane Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Sieben Anschnitte junger Zysten mit umgebender grünlicher Schicht und bis zu fünf großen Zellkernen mit deutlichen Nukleoli im Wirtszellzytoplasma. Eine Zyste mit einer pathologischen Mitosefigur im Zytoplasma.

Tag 10 und 11: Sieben und acht Zystenanschnitte mit bis zu drei Zellkernen, umgebender grünlicher Schicht und parasitophorer Vakuole mit < 10 Bradyzoiten. Die parasitophore Vakuole nahm ungefähr 1/5 des Wirtszellzytoplasmas ein. Eine Zyste zeigte eine pathologische Mitosefigur.

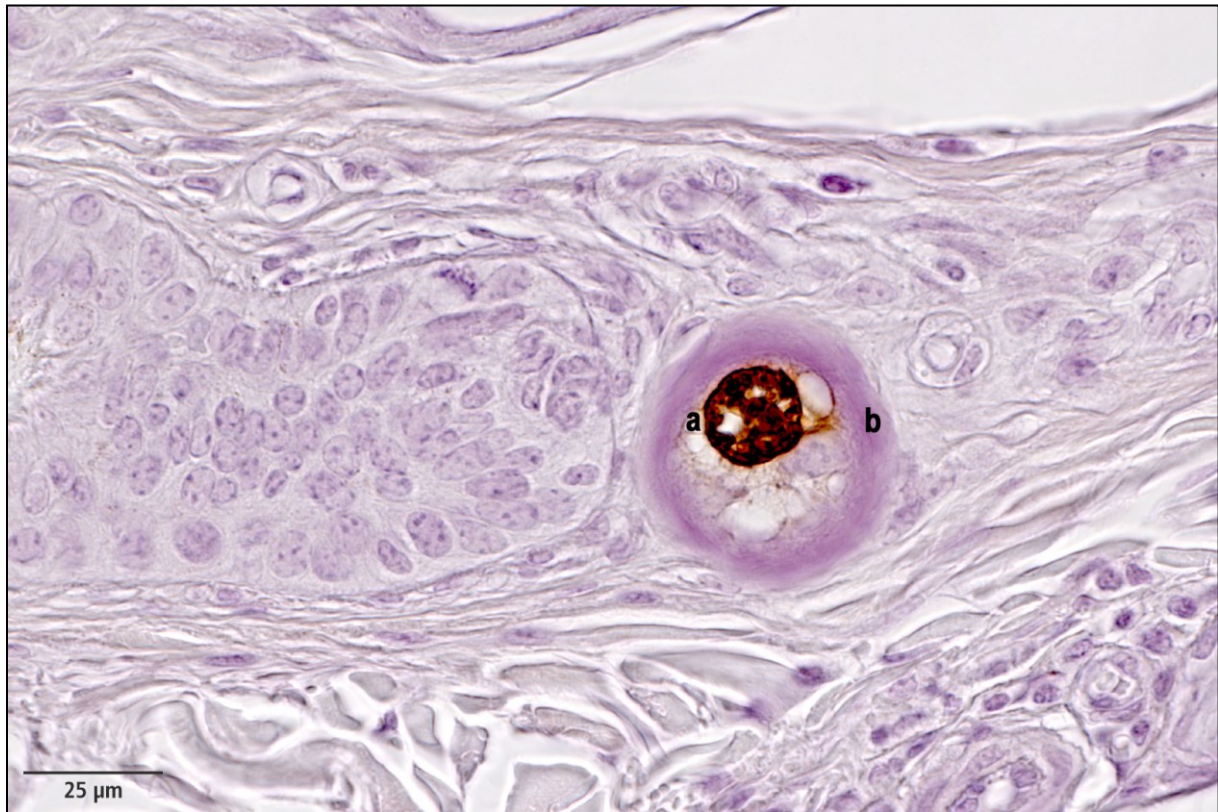


Abbildung IV-16: VT20, chronisches Stadium (Tag 12): Junge Zyste mit deutlich erkennbarer parasitophoren Vakuole und darin enthaltenen Bradyzoitenanschnitten (a) . Die umgebende violette Schicht entspricht der grünlichen Schicht in der HE-Färbung und stellt sich in der Hämalaun-Färbung violett dar (b). Keine erkennbaren perizystischen entzündlichen Infiltrationen. Paraffin, Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie, Hämalaun.

Tag 12 und 13: Ungleichmäßige gering- bis mittelgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. In Dermis und Subkutis wurden 18 (Tag 12) beziehungsweise 15 (Tag 13) Zystenanschnitte nachgewiesen. Das Wirtszellzytoplasma enthielt bis zu sechs Zellkerne und eine parasitophore Vakuole mit < 25 Bradyzoitenanschnitten (siehe **Abbildung IV-16**). Außerhalb der umgebenden grünlichen Schicht konnte eine weitere, dünne, elfenbeinfarbene, hyaline Schicht ausgemacht werden.

Tag 14 bis 19: Bis zu 48 Zystenanschnitte in Dermis und Subkutis. Der überwiegende Teil der Zysten hatten weiter an Größe zugenommen und befand sich in der Dermis. In der Subkutis

befanden sich meist nur einzelne Zysten. Im Wirtszellzytoplasma einer Zyste wurden bis zu zwölf Zellkerne gezählt. Mehrere Wirtszellkerne waren hochgradig hypertrophiert, gelappt und enthielten zahlreiche Nukleoli. In mehreren Zysten konnten pathologische Mitosefiguren gesehen werden (siehe **Abbildung IV-17**), bis zu zehn wurden gezählt. Im Wirtszellzytoplasma dieser Zysten konnten keine Zellkernanschnitte nachgewiesen werden. Die parasitophore Vakuole nahm ungefähr ein Drittel des Wirtszellzytoplasmas ein und enthielt zahlreiche Bradyzoiten. Die hyaline äußerste Zystenwand wurde zunehmend dicker und prominenter.

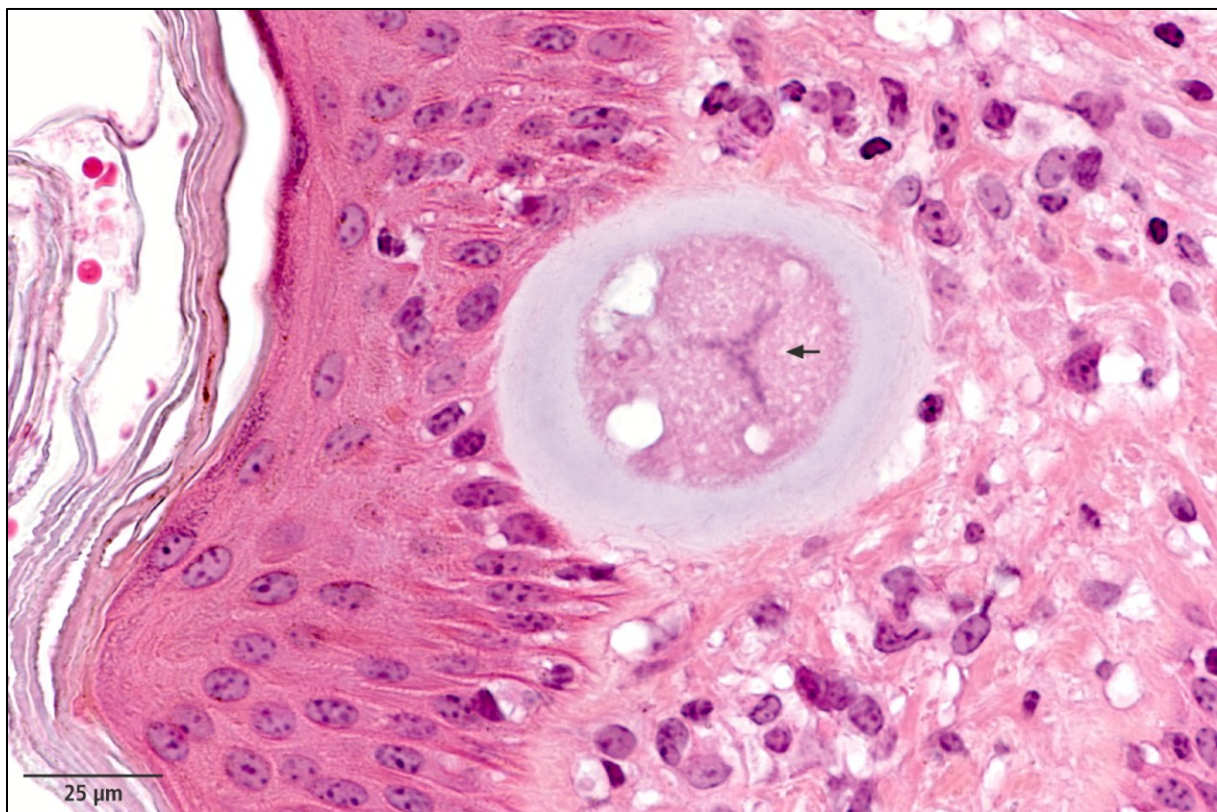


Abbildung IV-17: VT20, chronisches Stadium (Tag 14): Pathologische Mitosefigur im Wirtszellzytoplasma einer jungen Zyste (Pfeil). GMA/MMA, HE.

Tag 20: Manche der zahlreichen in der Dermis befindlichen Zysten lagen so eng beieinander, dass die hyalinen Schichten der einzelnen Zysten konfluieren. Zu diesem Zeitpunkt nahm die parasitophore Vakuole bis zur Hälfte des Wirtszellzytoplasmas ein.

Tag 22: Zusätzlich zu mehreren Zystenanschnitten wurden in der Immunhistochemie in der Tiefe der Dermis sowie oberflächlich extrazystische Signale detektiert. Die oberflächlichen Signale gruppierten sich semizirkulär um ein kleineres Gefäß, und es konnten einzelne rundliche Endozoiten-ähnliche Strukturen ausgemacht werden. Das in der Tiefe liegende

Signal bestand aus rundlichen Strukturen, die sich innerhalb eines kleinen Gefäßes befanden. In beiden Lokalisationen konnte keine parasitophore Vakuole nachgewiesen werden.

Tag 26, 29 und 33: Zahlreiche dermal sowie einzelne subkutan gelegene Zysten mit bis zu zwölf Zellkernen im Wirtszellzytoplasma und einer 2/3 des Wirtszellzytoplasmas einnehmenden, zentralen parasitophoren Vakuole mit zahlreichen Bradyzoitenanschnitten (siehe **Abbildung IV-49f**, S. 137f). Einzelne Zellkerne waren hochgradig hypertrophiert.

Tag 36: Zahlreiche reife Zysten mit großen parasitophoren Vakuolen, die nahezu das gesamte Wirtszellzytoplasma einnahmen. Innerhalb einer parasitophoren Vakuole fanden sich unzählige Bradyzoitenanschnitte sowie rundliche, grünliche Körperchen. Das Wirtszellzytoplasma war nur noch als schmales Band in der Peripherie zwischen parasitophorer Vakuole und Zystenwand zu erkennen. Auch die Zellkerne waren in die Peripherie gerückt. Die Zystenwand bestand aus der inneren, grünlichen und der äußeren hyalinen Schicht. Einzelne Zysten waren von zirkulär angeordneten spindelförmigen Zellen umgeben. In der Umgebung einzelner Zysten konnte eine geringgradige, überwiegend aus Lymphozyten und Plasmazellen bestehende Infiltration festgestellt werden.

Tag 40 und 47: Zahlreiche, überwiegend reife Zysten in Dermis und Subkutis mit großen parasitophoren Vakuolen und darin befindlichen Bradyzoiten und grünlichen Korpuskeln. Gering- bis mittelgradige, perizystische Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten und einzelnen Lymphozyten und Plasmazellen. Eine Zyste mit umgebender entzündlicher Infiltration wurde in der Scheide eines Haarfollikels gefunden (siehe **Abbildung IV-18**, S. 101).

Tag 54 und 61: Zahlreiche reife Zysten teilweise reaktionslos im Gewebe liegend, arealweise jedoch umgeben von bis zu hochgradigen entzündlichen Infiltrationen unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten. Das Zytoplasma der Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen war in Richtung der Zyste ausgerichtet mit in der Peripherie gelegenen Kernen. In einer Lokalisation fand sich eine von Makrophagen infiltrierte Zyste, die innerhalb eines Entzündungsherd lag. Innerhalb dieser Zyste konnten keine Teile der Wirtszelle oder Parasitenanschnitte nachgewiesen werden. In einer Zyste befanden sich zwei deutlich durch ein dünnes Septum des Wirtszellzytoplasmas getrennte parasitophore Vakuolen. Innerhalb der parasitophoren

Vakuole konnten mehrere grau-grünliche Körperchen gefunden werden, die überwiegend zentral lokalisiert waren (siehe **Abbildung IV-19**, S. 102).

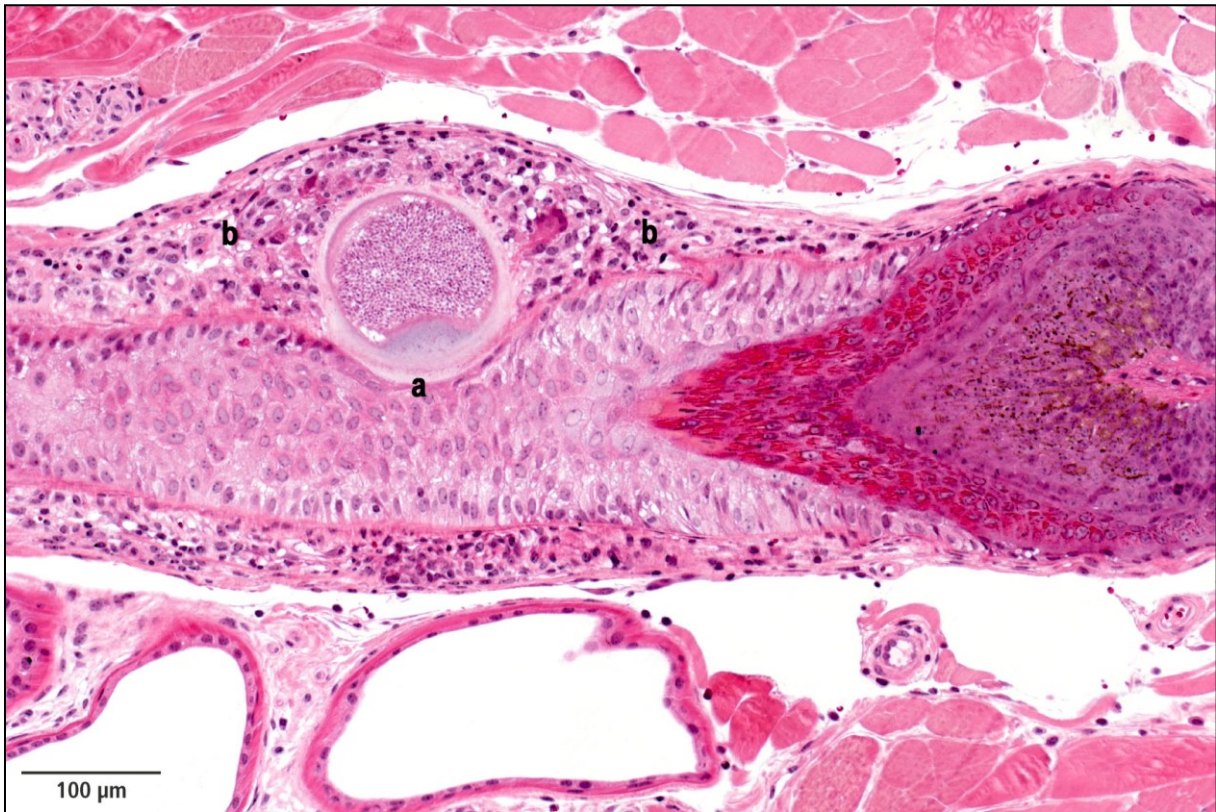


Abbildung IV-18: VT20, chronisches Stadium (Tag 47): Reife Zyste (a) in der Scheide eines Haarfollikels mit umgebender überwiegend granulomatöser Entzündung (b). GMA/MMA, HE.

Tag 68, 75, 82, 132 und Tag 211: Zahlreiche große, reife Zysten, sehr vereinzelt noch ohne perizystische entzündliche Infiltration, überwiegend jedoch umgeben von einer hochgradigen granulomatösen, eosinophil-granulozytären und lymphoplasmazellulären Entzündung. Zysten lagen häufig in Gruppen zusammen, so dass die hyalinen Schichten miteinander konfluieren. Neben den Zysten fanden sich mehrere Herde mit hochgradigen Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen.

Lysierte Zysten konnten weiterhin an mehreren Tagen nachgewiesen werden.

Nach Tag 22 konnten immunhistochemisch keine extrazystischen Signale mehr nachgewiesen werden.

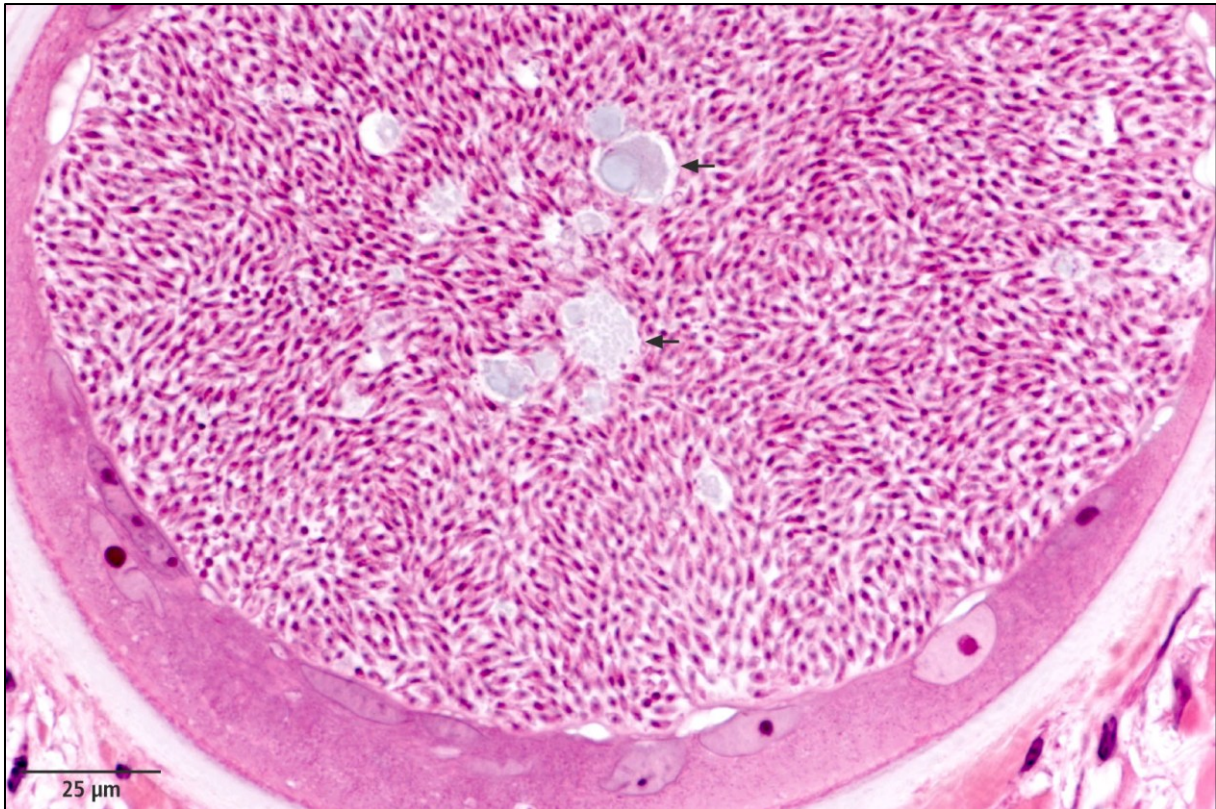


Abbildung IV-19: VT20, chronisches Stadium (Tag 61): Multiple grünliche korpuskuläre Elemente innerhalb einer parasitophoren Vakuole (Pfeile). GMA/MMA, HE.

1.4.4 Elektronenmikroskopie (akutes Stadium)

Tachyzoiten konnten nur in sehr wenigen Semidünnschnitten gefunden werden. Häufig gelang eine eindeutige Identifizierung nur bei systematischer Durchmusterung der Ultradünnschnitte. Neun Tachyzoiten konnten eindeutig identifiziert werden, sie wurden intrazellulär in Endothelzellen gefunden.

Tachyzoiten von *B. besnoiti* waren eher plump und kurz und hatten ein eher zugespitztes anteriores Ende und ein rundes posteriores Ende. Vier zur Messung herangezogene Tachyzoiten hatten eine Größe von $1,6-2,4 \times 3,2-4,9 \mu\text{m}$. Die Tachyzoiten zeigten den typischen Aufbau von Kokzidien-Tachyzoiten: dreischichtige Umhüllung (Pellicle), Konoid, Rhoptrien, Mikronemen, Mitochondrium, Endoplasmatisches Retikulum und dichte Granula.

Die dreischichtige Umhüllung bestand aus einer äußeren durchgängigen Membran, die den gesamten Parasiten umschloss. Der innere Membrankomplex bestand aus zwei Membranen, die am vorderen Ende des Parasiten unterbrochen waren.

Das Endoplasmatische Retikulum war in fast allen Fällen aufgeweitet und bildete Lakunen, die insbesondere in der Umgebung des Kerns zu sehen waren.

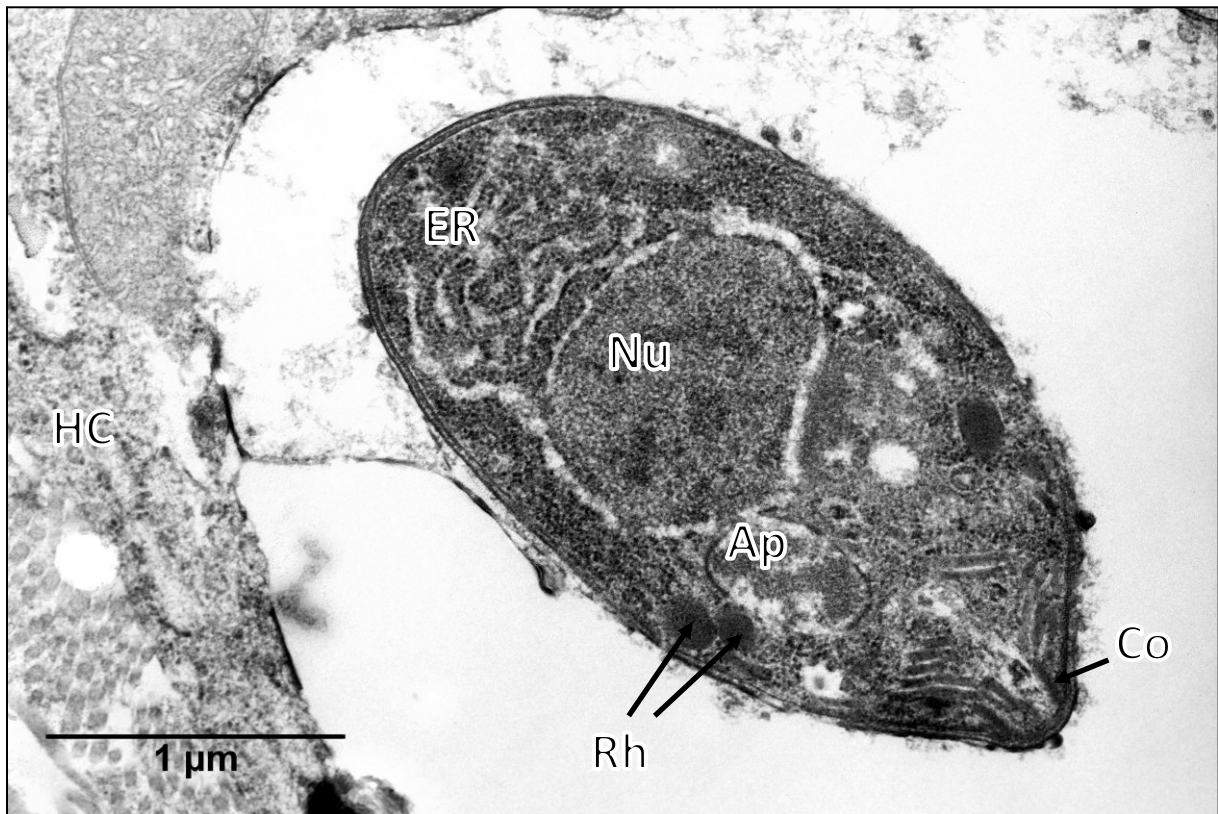


Abbildung IV-20: VT20, Akutes Stadium (Tag 1): Tachyzoit von *B. besnoiti* in einer Endothelzelle in der Haut. Ap, Apicoplast; Co, Konoid; ER, Endoplasmatisches Retikulum; HC, Wirtszellzytoplasma; Nu, Nukleus; Rh, Rhoptrien. TEM.

1.5 Versuchstier 22

Das weibliche Limousinrind VT22 war bei Vorstellung vier Jahre und einen Monat alt (*20.06.2005), tragend und serologisch negativ für Antikörper gegen BHV-1 und BVDV-Antigen. Dieses Tier war ausgesprochen scheu und reagierte bei Fixation mit heftigsten Abwehrbewegungen. Es wurde daher in nicht regelmäßigen Abständen untersucht und beprobt.

1.5.1 Klinik

Am Vorstellungstag (07.10.2009) zeigte das Tier eine geringgradige Lahmheit, reduziertes Allgemeinbefinden und wirkte niedergeschlagen. Augen- und/oder Nasenausfluss wurden

beobachtet. Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz waren nicht erhöht und es konnten keine Veränderungen der Haut oder der peripheren Lymphknoten festgestellt werden.

Das Tier wurde in nicht regelmäßigen Abständen untersucht. Zwölf Tage nach Vorstellung konnten in der skleralen Konjunktiva Zysten nachgewiesen werden, deren Anzahl zwischen elf und 20 (Kategorie 3) lag. Am 5.11.2009 wurde eine geringgradige Verdickung der Haut festgestellt, die Anzahl der Zysten in der skleralen Konjunktiva lag an diesem Tag bei über 30.

Die Veränderungen der Haut schritten fort, am 29.12.2009 war eine hochgradige Hautverdickung mit einhergehender Faltenbildung nachweisbar. Speziell in haarlosen Hautarealen wie beispielsweise am Euter waren diese Veränderungen deutlich sichtbar. Am selben Tag konnten auch Zysten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* gefunden werden.

Trotz wiederholter Behandlung der im chronischen Stadium aufgetretenen, tiefreichenden Klauenläsionen, in Form von komplizierten Klauengeschwüren, konnte keine Verbesserung der Klauengesundheit erreicht werden. So wurde das Tier am 13. April 2010 euthanasiert und im Institut für Tierpathologie seziert (siehe Abschnitt 2.2, S. 113).

1.5.2 Serologie und PCR

Am Tag der Vorstellung konnte im IFAT bereits ein reziproker Titer von 400 nachgewiesen werden und der Tachyzoiten-Blot zeigte fünf Banden. Das Tier hatte zu diesem Zeitpunkt bereits serokonvertiert. In der PCR konnte bereits Parasiten-DNA in der Haut nachgewiesen werden.

Die Menge an nachgewiesener Parasiten-DNA in der Haut nahm im Laufe der Wochen immer weiter zu. Auch der Antikörper-Titer erhöhte sich stetig, so dass bereits vier Wochen nach Vorstellung das Titer-Maximum von 6400 erreicht war (siehe **Abbildung IV-21**, S. 105).

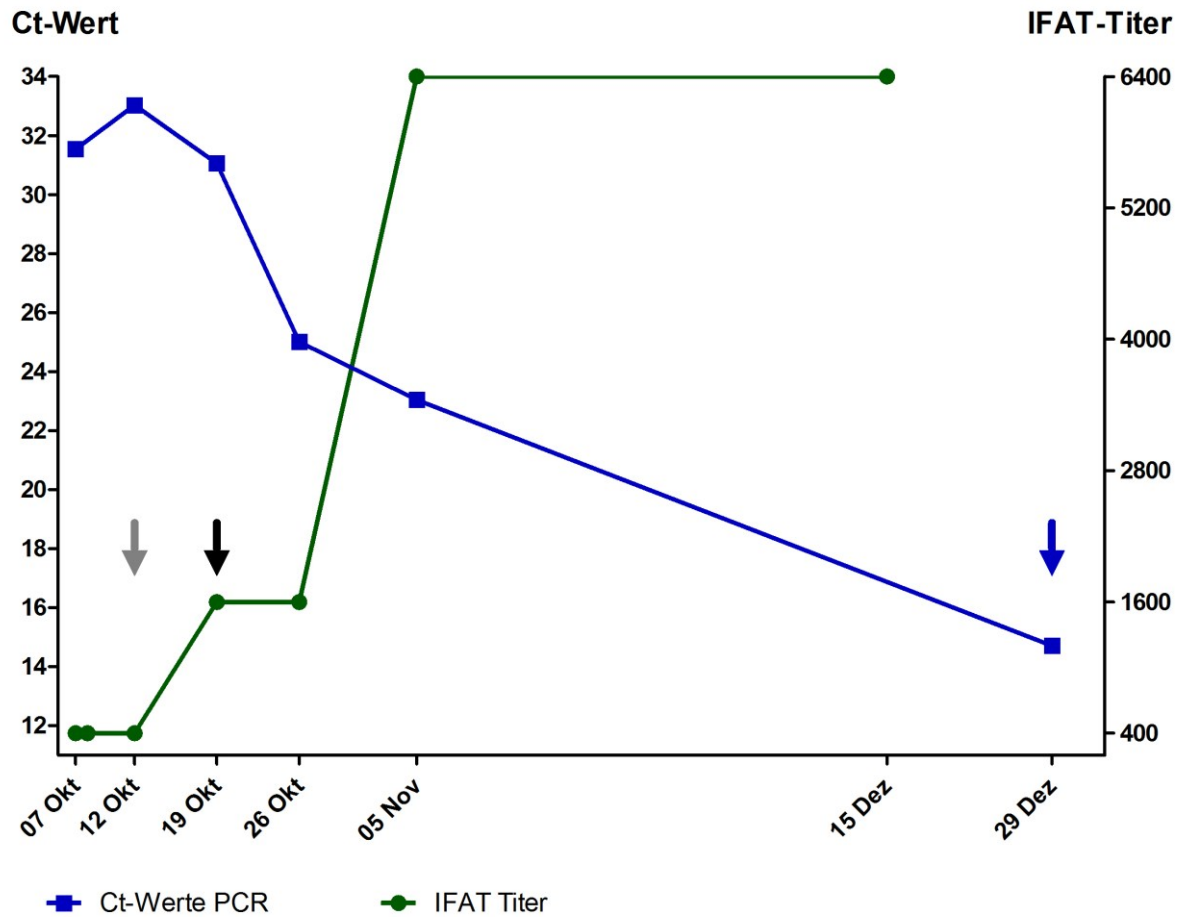


Abbildung IV-21: VT22, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich. Der graue Pfeil markiert den histologischen Nachweis der ersten Zyste. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Nachweis erster Zysten in der skleralen Konjunktiva. Der blaue Pfeil markiert den Nachweis erster Zysten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae*.

1.5.3 Histologie

Tag 1: Am Tag der Vorstellung zeigte die Haut ein hochgradiges diffuses Ödem sowie hochgradige diffuse Infiltrationen mit eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen und Lymphozyten. In den Routinefärbungen konnten keine Parasitenstadien identifiziert werden. In der Immunhistochemie wurden mehrere Tachyzoiten in Dermis und Subkutis in Endothelzellen und der Gefäßmedia sowie peri- und intravaskulär nachgewiesen. Parasitenleib und die Membran der parasitophoren Vakuole produzierten ein deutliches positives Signal. Tachyzoiten lagen überwiegend einzeln innerhalb einer parasitophoren Vakuole.

Tag 6: Die nächste Hautprobe wurde fünf Tage später entnommen. Es wurden gering- bis mittelgradige perivaskuläre Zellinfiltrationen unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten sowie ungleichmäßiges, diffuses, dermales Ödem gefunden. Drei kleine, junge Zysten konnten bereits in der Routinefärbung in der Dermis aufgefunden werden, eine Zyste war in der Gefäßmedia mittelgroßer Gefäße lokalisiert. Eine Zyste bestand aus einer hypertrophierten Wirtszelle mit eosinophilem Zytoplasma, die zu diesem Zeitpunkt bis zu zwei vergrößerte Zellkerne enthielt. Es wurde keine parasitophore Vakuole mit darin enthaltenen Bradyzoiten angeschnitten. Zysten waren umgeben von einer grünlichen Schicht. Immunhistochemisch konnten in diesem Stadium bereits Bradyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole in den jungen Zysten nachgewiesen werden.

Tag 13: Im nächsten Präparat waren fünf Zystenanschnitte zu sehen, die weiter an Größe zugenommen hatten. Das Wirtszellzytoplasma wirkte stellenweise schaumig und enthielt mehrere kleine Vakuolen und bis zu fünf Zellkernanschnitte. In den Routinefärbungen konnten Bradyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole identifiziert werden. Zysten waren in der Dermis lokalisiert, einzelne Zysten konnten auch in der *Tunica media* mittelgroßer Gefäße gefunden werden.

Tag 20: Zahlreiche Zystenanschnitte in der Dermis. In einzelnen Zysten wurden bis zu 17 Zellkernanschnitte gezählt. Zysten und parasitophore Vakuolen waren größer geworden und enthielten bis zu 20 Parasitenanschnitte. Außerhalb der grünlichen Schicht wurde eine weitere, porzellanfarbene, hyaline Schicht sichtbar. Zysten bestanden zu diesem Zeitpunkt von innen nach außen aus vier Schichten: Parasitophore Vakuole mit Bradyzoiten, Wirtszellzytoplasma mit Zellkernen, innere grünliche Schicht und die äußerste hyaline Schicht. Zysten waren in der Dermis zu finden.

Tag 30: Zysten wurden nicht nur wie bisher in der Dermis, sondern auch in der Subkutis gefunden. Die Wirtszelle hatte sich weiter vergrößert und die parasitophore Vakuole enthielt zahlreiche Bradyzoiten und nahm ca. zwei Drittel des Wirtszellzytoplasmas ein.

Tag 84: Zahlreiche reife Zysten, mit einer großen parasitophoren Vakuole und in die Peripherie gedrängtes Wirtszellzytoplasma und Zellkerne. Die äußere hyaline Schicht war wesentlich dicker als die innere grünliche Schicht, teilweise lagen die Zysten in Gruppen, so dass die hyalinen Schichten mehrerer Zysten konfluieren. Innerhalb der parasitophoren

Vakuole befanden sich zahlreiche Bradyzoiten sowie grün-gräuliche, runde Körperchen. In der Umgebung mehrerer Zysten wurde eine entzündliche Zellinfiltration nachgewiesen, die bei manchen Zysten von geringem Ausprägungsgrad, bei anderen Zysten jedoch bis zu hochgradig war. Die Entzündungszellinfiltrate setzten sich aus Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten zusammen. Das Zytoplasma der Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen war auf die Zysten hin ausgerichtet und ihre Zellkerne zystenfern lokalisiert. In einer Lokalisation konnte eine zerstörte Zyste nachgewiesen werden, die mit Makrophagen infiltriert war. Hier konnten nur noch Reste der hyalinen Schicht nachgewiesen werden, Strukturen der Wirtszelle oder Bradyzoiten waren nicht mehr erkennbar.

1.6 Übersicht der Zystenentwicklung

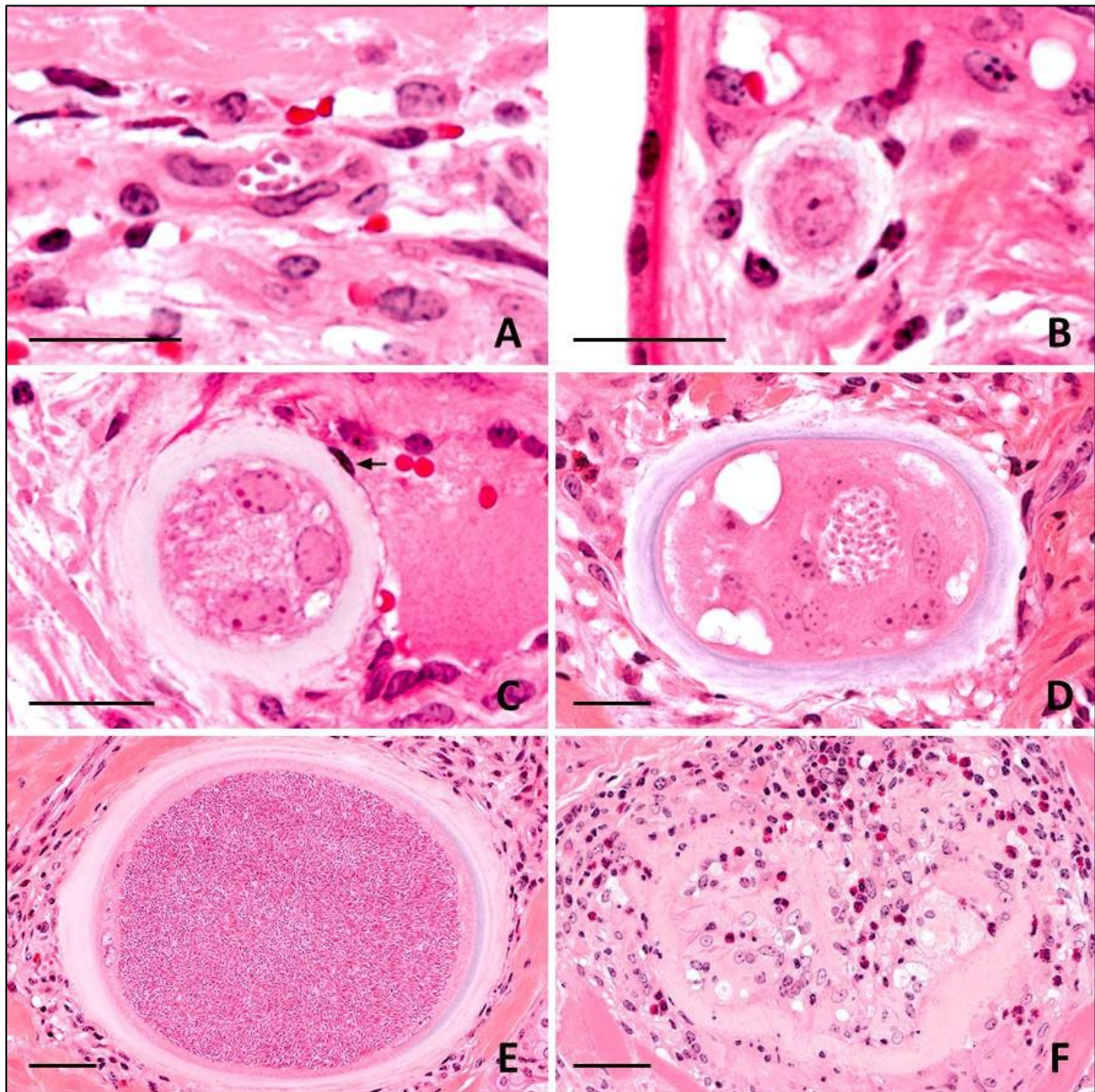


Abbildung IV-22: Übersicht der Zystenentwicklung: **A**, mehrere Tachyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole (VT20, Tag 1); **B**, junge Zyste, bestehend aus hypertrophierter Wirtszelle und einem Zellkern (VT20, Tag 6); **C**, junge Zyste in der Gefäßwand direkt unter dem Endothel (Pfeil, VT20, Tag 14); **D**, junge Zyste mit zentraler parasitophorer Vakuole und darin befindlichen Bradyzoiten (VT20, Tag 26); **E**, typische, reife *B. besnoiti*-Zyste (VT20, Tag 293); **F**, Zerstörung der Zyste durch Makrophagen und eosinophile Granulozyten (VT22, Tag 189). A-D, Balken = 25 µm; E+F, Balken = 50 µm. GMA/MMA, HE.

2 Sektion

2.1 Sektion Versuchstier 20

2.1.1 Makroskopische Befunde

Das Tier zeigte einen reduzierten Ernährungszustand und eine hochgradige generalisierte Verdickung der Haut, die an vielen Stellen hypotrichot oder alopezisch war. Alle peripheren Lymphknoten waren hochgradig vergrößert.

An beiden Hintergliedmaßen war die Klauenlederhaut multifokal hochgradig entzündet, an den Klauenspitzen befand sich eine hochgradige nekrotisierende, teilweise mit Sequesterbildung einhergehende Osteomyelitis.

Zahlreiche weiße miliare Herde, die wie *B. besnoiti*-Zysten aussahen, konnten in der Unterhaut, in der Muskulatur und Faszien von Hintergliedmaßen, Schwanz und Hals, in der Schleimhaut von Nase, Larynx, Trachea, Bronchien und Vagina, in der skleralen Konjunktiva und im rechten Vorhof des Herzens nachgewiesen werden. Ein einzelner weißer miliarer Herd wurde in der Kapsel der Milz gesehen. Im Pansen wurde ein hochgradiger Befall mit *Paramphistomum* spp. festgestellt.

2.1.2 Histologische Befunde

Typische *B. besnoiti*-Zysten (siehe **Abbildung IV-23**, S. 110) mit umgebender dicker hyaliner Schicht, schmalem Wirtszellzytoplasma, mehreren hypertrophierten Zellkernen und zahllosen Bradyzoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole wurden in diversen Geweben gefunden (siehe **Tabelle IV-1**, S.117). *B. besnoiti*-Zysten lagen entweder reaktionslos im Gewebe oder waren umgeben von einer gering- bis hochgradigen entzündlichen Infiltration unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen.

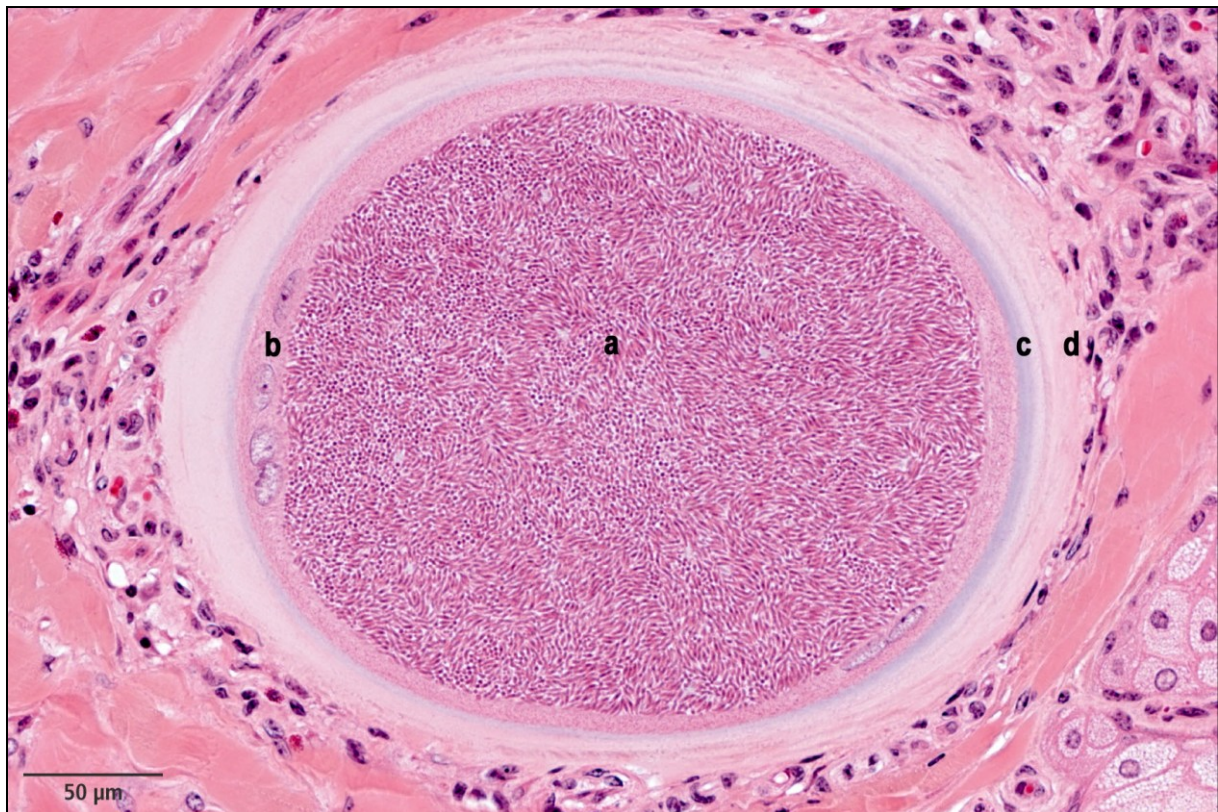


Abbildung IV-23: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Typische ausgereifte Zyste mit zentraler parasitophorer Vakuole und darin befindlichen zahlreichen Bradyzoiten (a). Das Wirtszellzytoplasma ist in der Peripherie als Band zu erkennen und beinhaltet mehrere, hypertrophierte an den Rand gedrängte Zellkerne mit deutlichen Nukleoli (b). Die Zystenwand setzt sich aus einer inneren, dünnen grünlichen Schicht (c) und einer äußeren, dickeren hyalinen Schicht zusammen (d). GMA/MMA, HE.

In mehreren Lokalisationen konnten auch lysierte Zysten nachgewiesen werden, in deren Lumen entzündliche Zellinfiltrationen gefunden werden konnten.

Die Klauenlederhaut war hochgradig mit *B. besnoiti*-Zysten befallen, insbesondere hier zeigte sich häufig ein Konfluieren der hyalinen Schichten mehrerer Zysten. Zysten lagen direkt subepithelial in der Klauenlederhaut und führten in einigen Fällen zu einer Verdrängung der epithelialen Lamellen der Lederhaut (siehe **Abbildung IV-24f**, S. 111f).

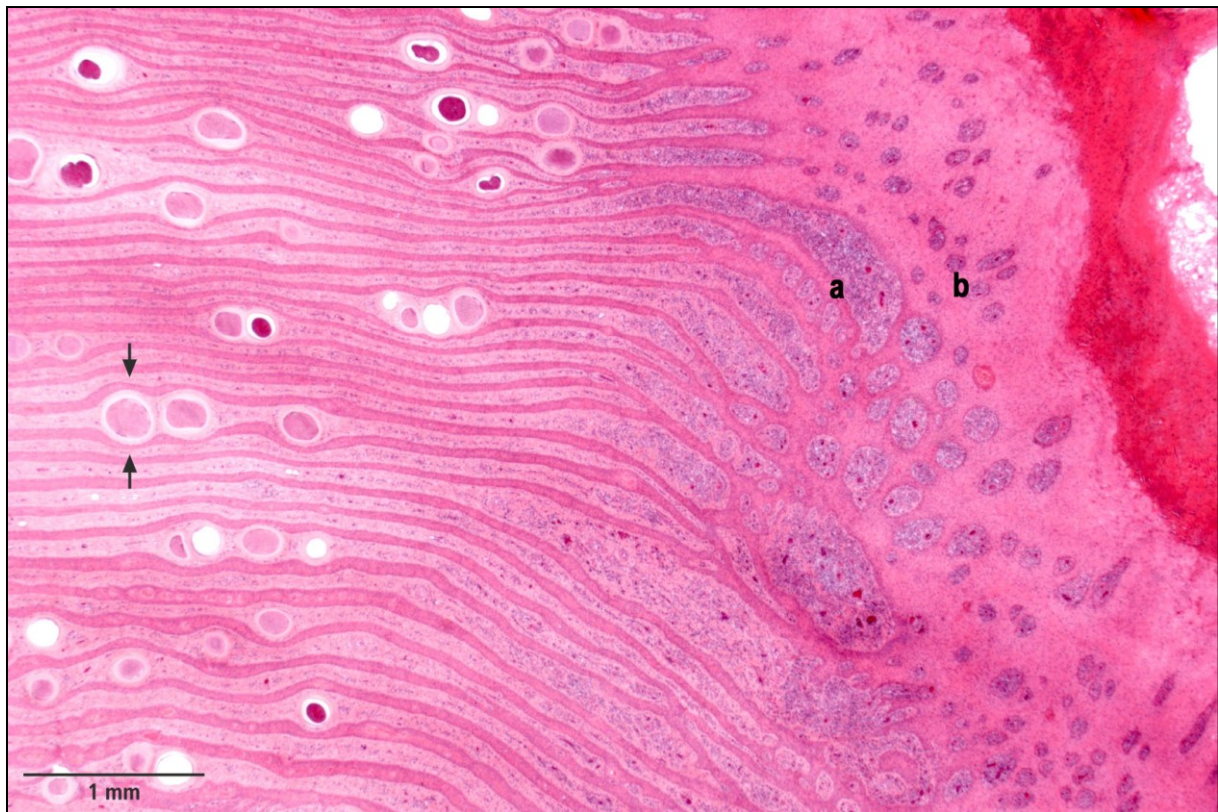


Abbildung IV-24: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Zahlreiche *Besnoitia*-Zysten in der Klauenlederhaut mit Verdrängung der epithelialen Lamellen (Pfeile). Diffuse, hochgradige, entzündliche Zellinfiltrationen (a) direkt unterhalb des Horn-bildenden Epithels (b). GMA/MMA, HE.

Eine von den Zysten unabhängige Entzündung der Klauenlederhaut war schwierig abzugrenzen. Jedoch war eine hochgradige multifokale, eitrig-nekrotisierende Pododermatitis, abschnittsweise mit Nachweis zahlreicher, teils fusiformer Bakterien klar zu erkennen. An mehreren Stellen war eine mittel- bis hochgradige lymphoplasmazelluläre, eosinophil- und neutrophil-granulozytäre Infiltration der Klauenlederhaut vorhanden mit ausgeprägter Ödematisierung, multifokaler Exozytose und Nekrose der darüber liegenden epithelialen Zellschicht (siehe **Abbildung IV-26**, S. 113).

Die peripheren Lymphknoten waren hyperplastisch und zeigten teilweise eine Sinushistiozytose. In Dünn- und Dickdarm war die *Lamina propria mucosae* hochgradig diffus mit eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten infiltriert. In der Skelettmuskulatur wurden vereinzelte intrazelluläre Zysten vom *Sarcocystis*-Typ gefunden.

Bradyzoiten und parasitophore Vakuole reagierten positiv in der anti-*Besnoitia* Immunhistochemie. Es wurden in den untersuchten Hautschnitten und parenchymatösen Organen keine extrazystischen Signale detektiert.

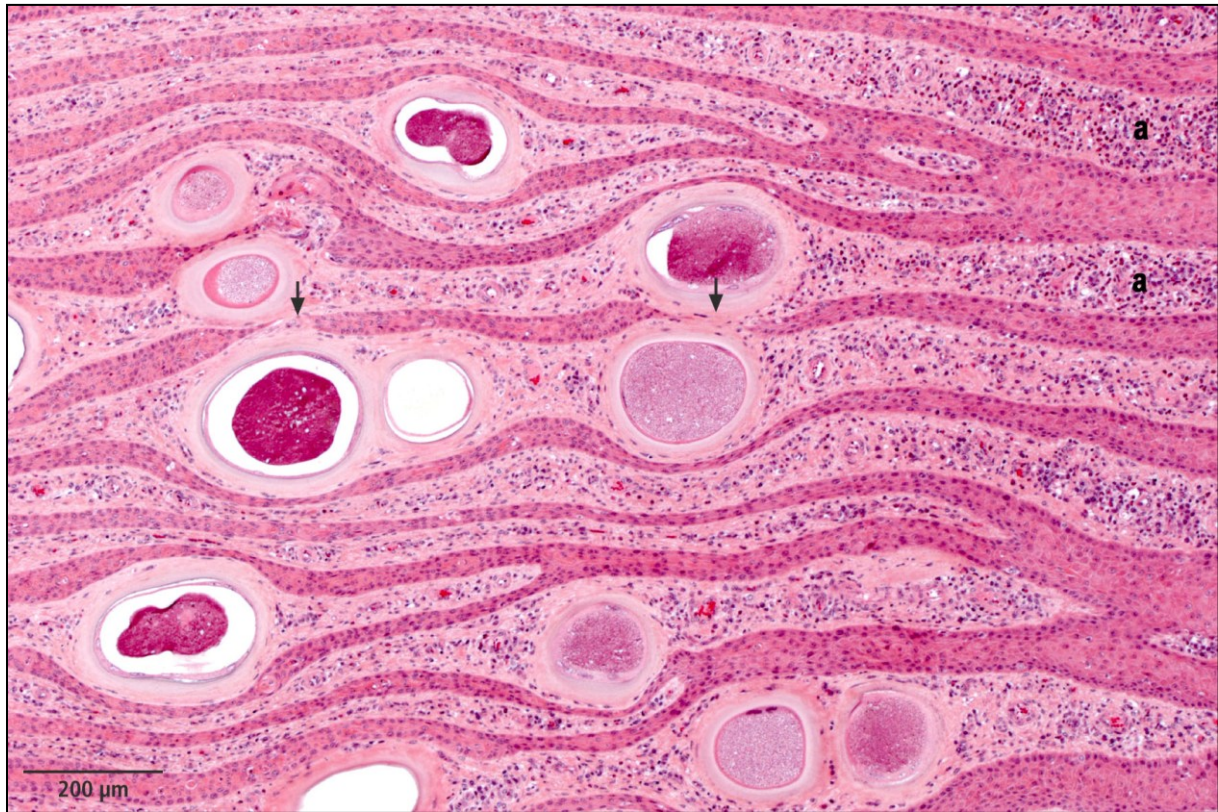


Abbildung IV-25: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Zahlreiche reife *Besnoitia*-Zysten in der Klauenlederhaut mit Verdrängung der epithelialen Lamellen (Pfeile). Daneben hochgradige, diffuse, subepitheliale Zellinfiltrationen (Sterne). GMA/MMA, HE.

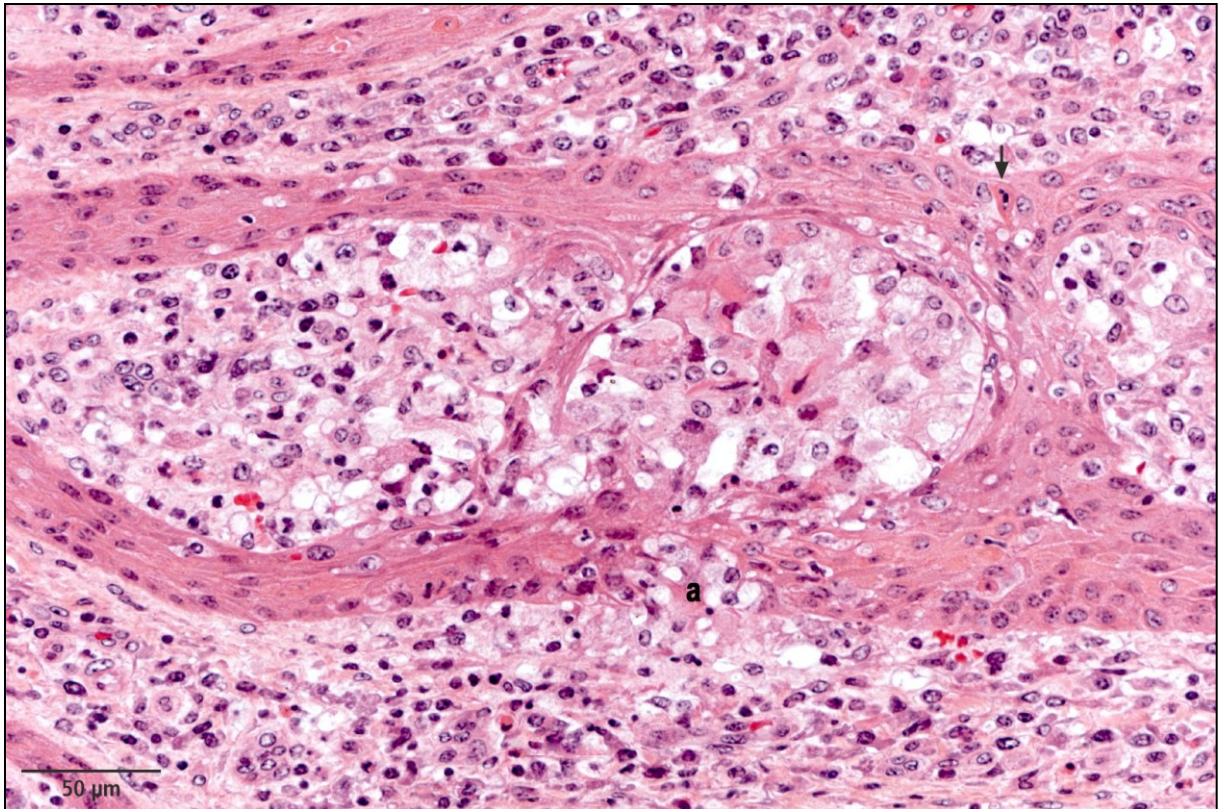


Abbildung IV-26: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Klauenlederhaut: Hochgradige, diffuse, eosinophil-granulozytäre und lymphoplasmazelluläre Zellinfiltrate. Daneben diffuses, ausgeprägtes, subepitheliales Ödem sowie epitheliale Zellinfiltrationen (a) und Nekrose von Keratinozyten (Pfeil). GMA/MMA, HE.

2.2 Sektion Versuchstier 22

2.2.1 Makroskopische Befunde

Dieses Tier zeigte einen guten Ernährungszustand und eine hochgradige generalisierte Verdickung der Haut. Auch hier waren viele Stellen hypotrichot oder alopezisch und alle peripheren Lymphknoten hochgradig vergrößert.

An allen untersuchten Klauen waren die Klauenbeinspitzen abgesenkt und an der rechten lateralen Klauenbeinspitze wurde eine hochgradige nekrotisierende Osteomyelitis diagnostiziert.

Zahlreiche weiße miliare Herde (*B. besnoiti*-Zysten) wurden in Unterhaut und Faszien (siehe **Abbildung IV-27**, S. 114), in der skleralen Konjunktiva (siehe **Abbildung IV-28**, S. 114) und in der Schleimhaut von Nase, Trachea und Vagina gefunden.



Abbildung IV-27: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zahlreiche *B. besnoiti*-Zysten in der Faszie.

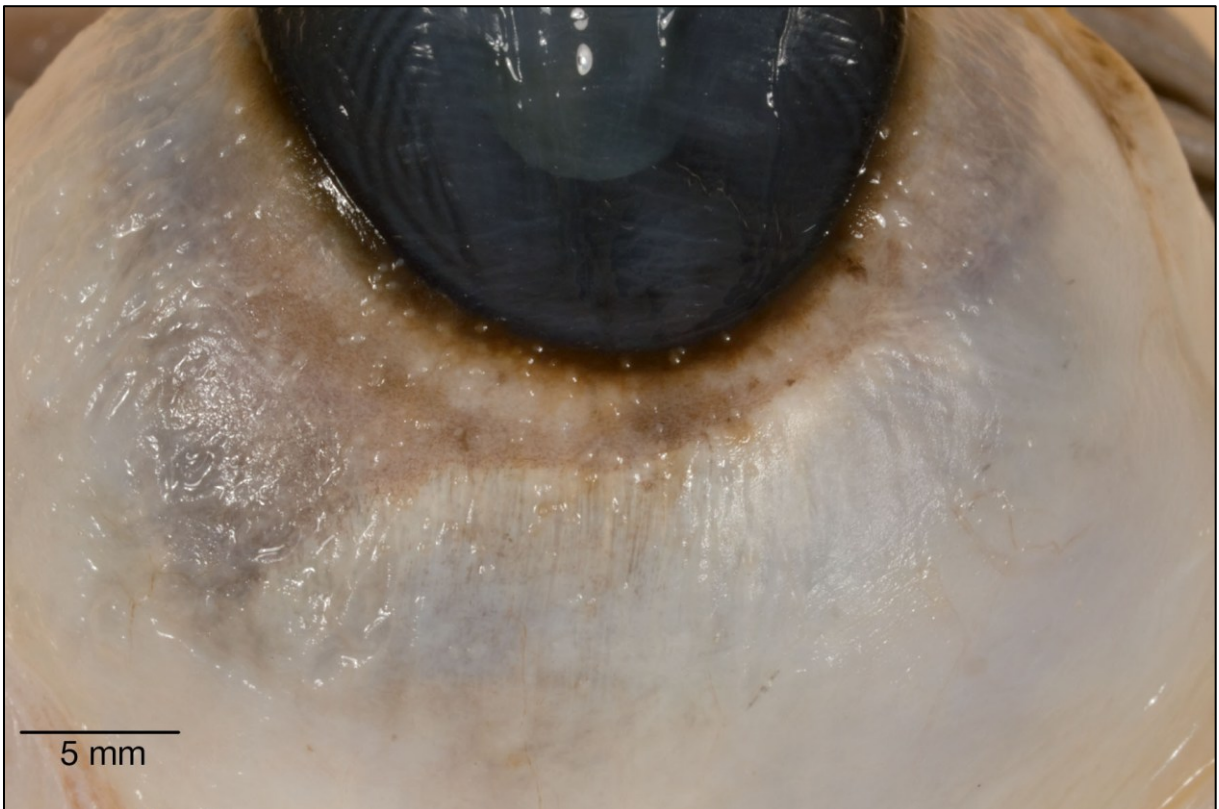


Abbildung IV-28: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zahlreiche *B. besnoiti*-Zysten in der skleralen Konjunktiva.

Der Labmagen war mittelgradig multifokal ulzeriert mit einem Durchmesser der Ulzera von bis zu 4 mm.

2.2.2 Histologische Befunde

B. besnoiti-Zysten wurden in diversen Geweben gefunden (siehe **Tabelle IV-1**, S.117).

B. besnoiti-Zysten lagen entweder reaktionslos im Gewebe oder waren umgeben von einer gering- bis hochgradigen entzündlichen Infiltration unter Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen.

In mehreren Lokalisationen konnten auch lysierte Zysten nachgewiesen werden, in deren Lumen entzündliche Zellinfiltrationen gefunden werden konnten (siehe **Abbildung IV-29** und **Abbildung IV-30**, S. 116).

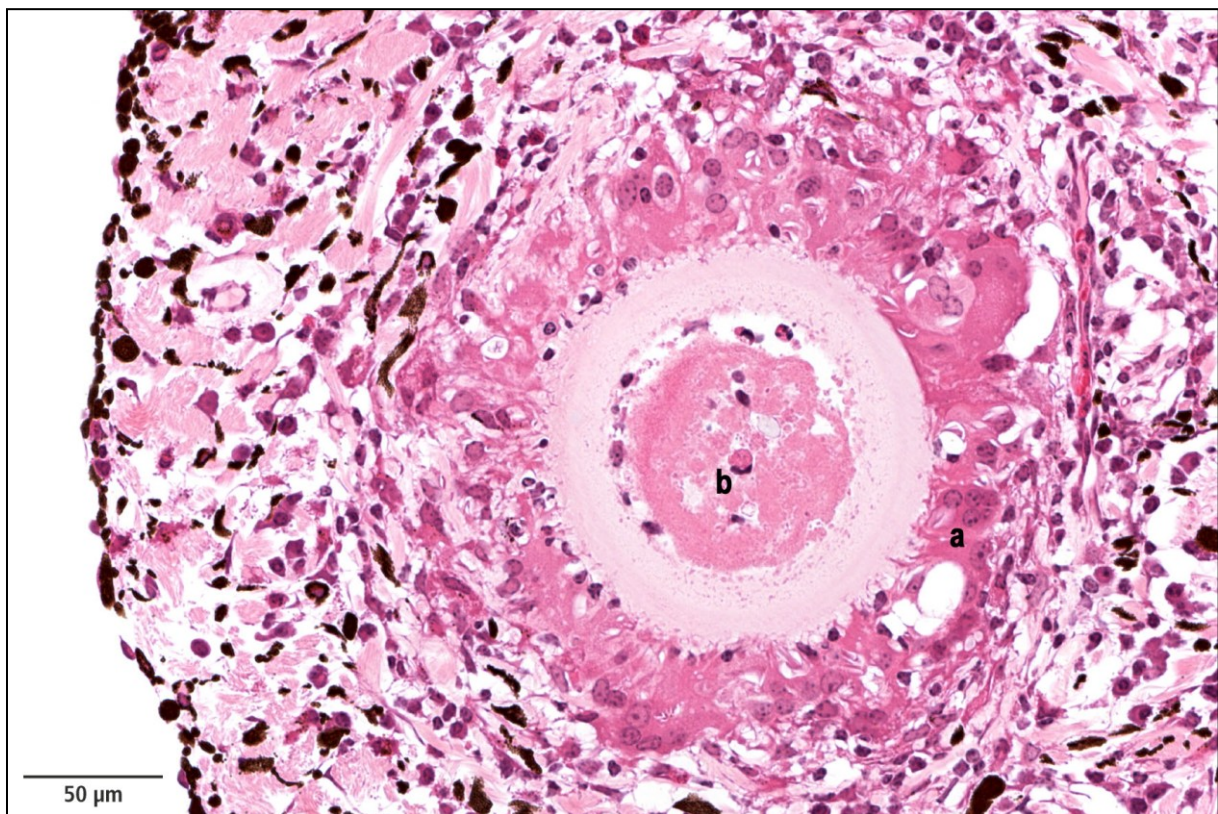


Abbildung IV-29: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zyste im Irisstroma mit ausgeprägter, umgebender Infiltration von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen (a). Im Zystenlumen sind granulozytäre Zellinfiltrate zu erkennen (b), Strukturen der Wirtszelle oder Bradyzoiten sind nicht mehr erkennbar. GMA/MMA, HE.

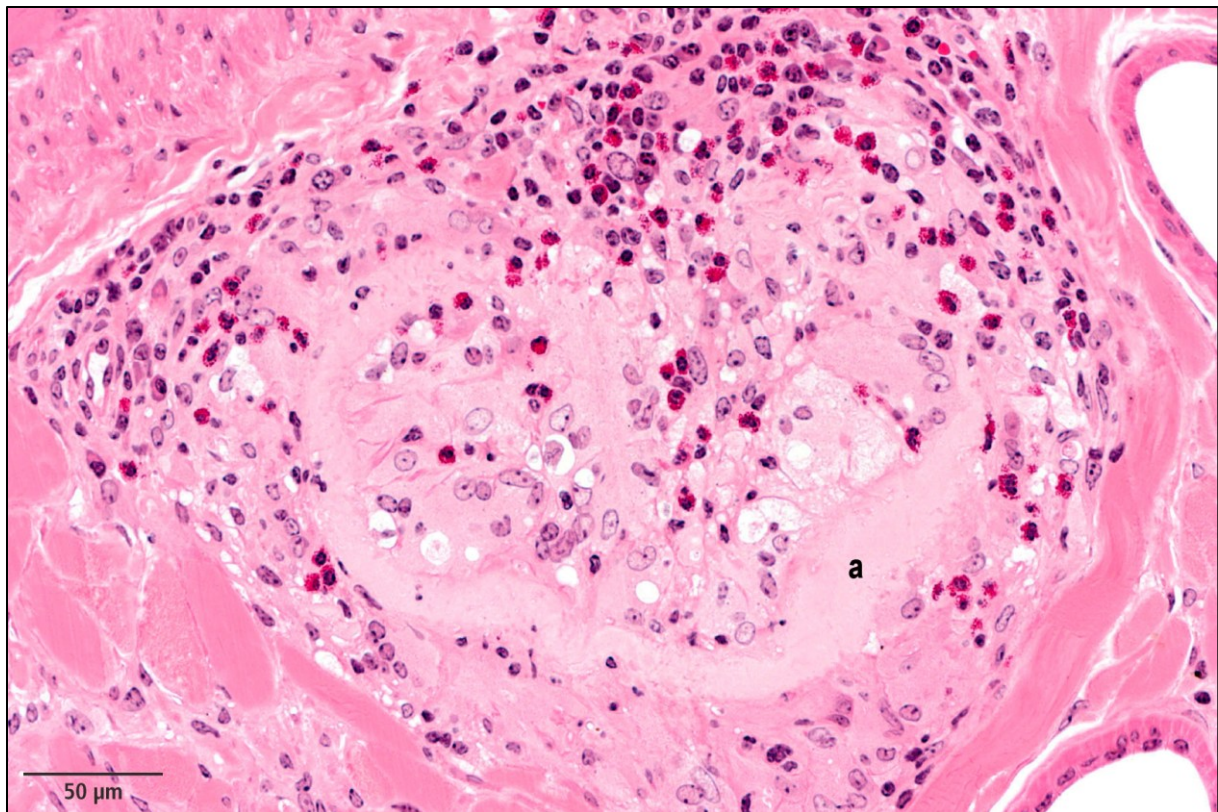


Abbildung IV-30: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Invasion des Zystenlumens mit Makrophagen und eosinophilen Granulozyten. Von der hyalinen Schicht sind nur noch Überreste erkennbar (a). GMA/MMA, HE.

In der Skelettmuskulatur gefundene Zysten zeigten häufig keine rundliche Gestalt mehr, sondern waren an mehreren Stellen eingedrückt. Einzelne längliche Zysten konnten zwischen den Muskeln beobachtet werden, deren Längsdurchmesser deutlich über dem Querdurchmesser lag. In der Faszie gelegene Zysten waren manchmal umgeben von einer spindelförmigen Schicht, die der hyalinen Schicht außen direkt anlag (siehe **Abbildung IV-31**, S. 118). Eine zusätzlich umgebende entzündliche Reaktion befand sich häufig außerhalb dieser Spindelzell-Schicht. Vereinzelt Zysten enthielten mehrere parasitophore Vakuolen, die durch ein dünnes Wirtszellzytoplasmaseptum voneinander getrennt waren.

Der Befall der Klauenlederhaut mit *B. besnoiti*-Zysten war hochgradig. Oft konfluieren die hyalinen Schichten mehrerer nebeneinander liegender Zysten.

Tabelle IV-1: Gewebe in denen bei der Sektion von VT20 und VT22 Zysten gefunden wurden.

Organsystem	Gewebe/Lokalisation	Methode
Haut	Haut (generalisiert), Augenlider, Klauenlederhaut	histologisch
	Unterhaut	makroskopisch, histologisch
Bewegungsapparat	Faszie und Muskulatur (Kopf, Hals, Rumpf, Schwanz, Gliedmaßen)	makroskopisch, histologisch
	Epitendineum	histologisch
Auge	sklerale Konjunktiva	makroskopisch, histologisch
	Sklera, Nickhaut, Iris, Augenmuskulatur	histologisch (siehe Abbildung IV-32 , S. 118)
Respirationstrakt	Nasenschleimhaut, Trachea, Bronchien	makroskopisch, histologisch
	Kehldeckel	makroskopisch
	Lunge, Markraum einer Konche	histologisch
Digestionstrakt	Maulschleimhaut, Speicheldrüse	histologisch
Weiblicher Geschlechtsapparat	<i>Vestibulum vaginae</i>	makroskopisch, histologisch
Lymphsystem	Milz-Kapsel	makroskopisch
	Kapsel eines abdominalen Hämallymphknotens	histologisch
Kardiovaskuläres System	große Gefäße, Venen der distalen Gliedmaßen, <i>V. auricularis</i> , <i>V. jugularis</i> (<i>T. media et adventitia</i>), Venenklappen	histologisch (siehe Abbildung IV-33 , S. 119)
	Herz (rechter Vorhof)	makroskopisch
Nervensystem	Epineurium (Hautnerv)	histologisch

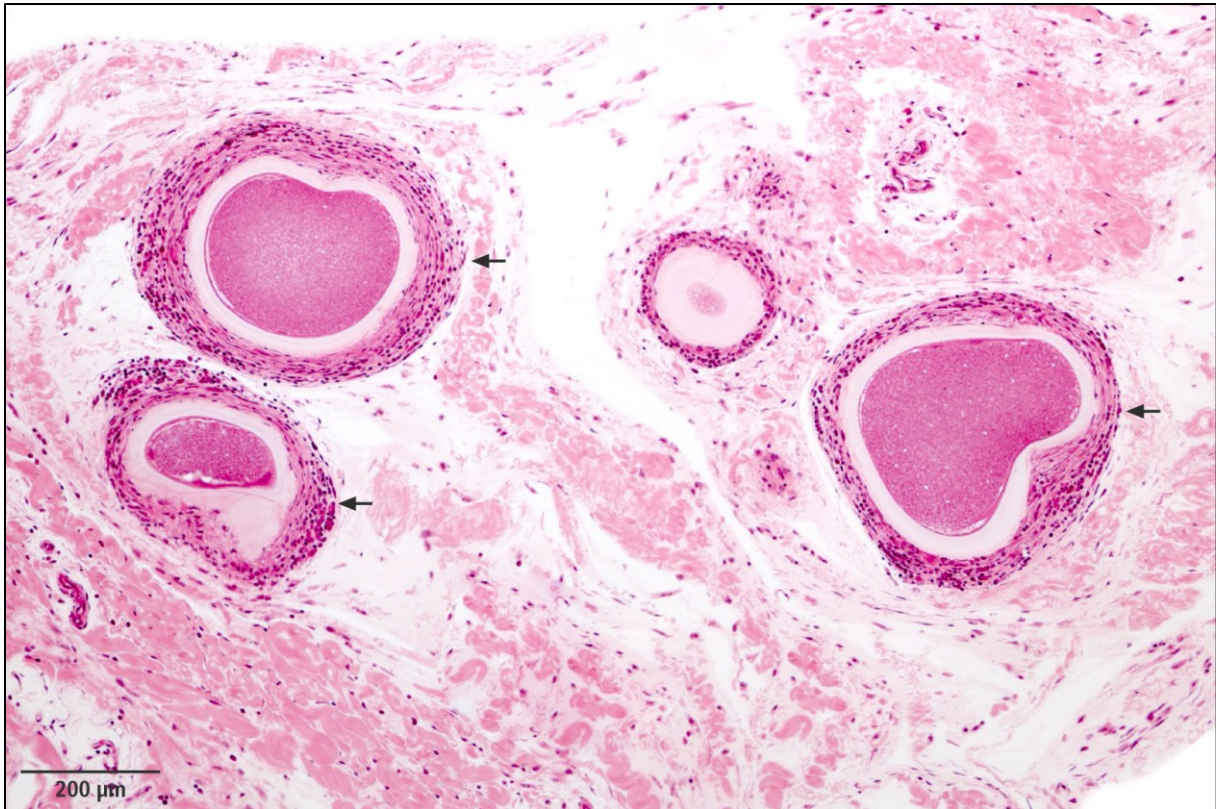


Abbildung IV-31: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Mehrere reife Zysten in der Faszie umgeben von einer spindelzelligen Schicht (Pfeile). GMA/MMA, HE.

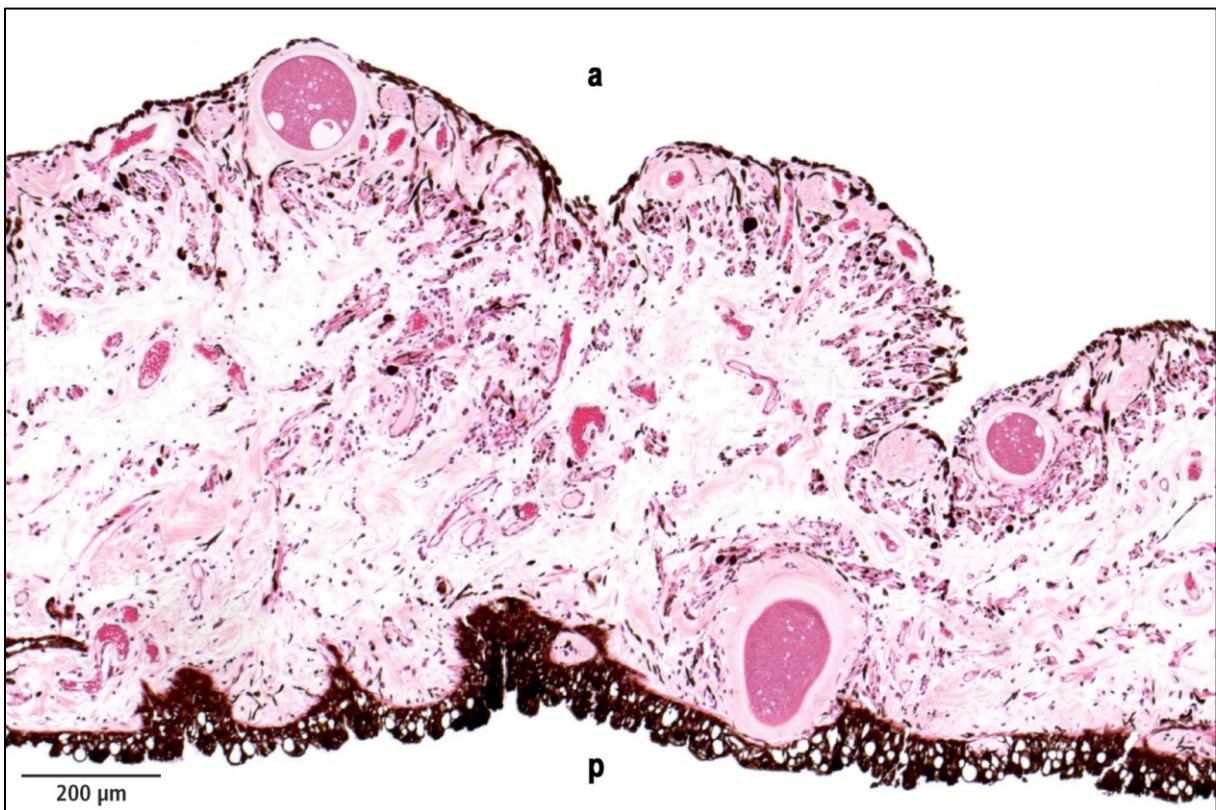


Abbildung IV-32: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Drei Zysten im Stroma der Iris. Direkt unter dem posterioren (p) Epithel und den anterioren (a) Fibroblasten liegende Zysten wölben sich deutlich nach außen. GMA/MMA, HE.

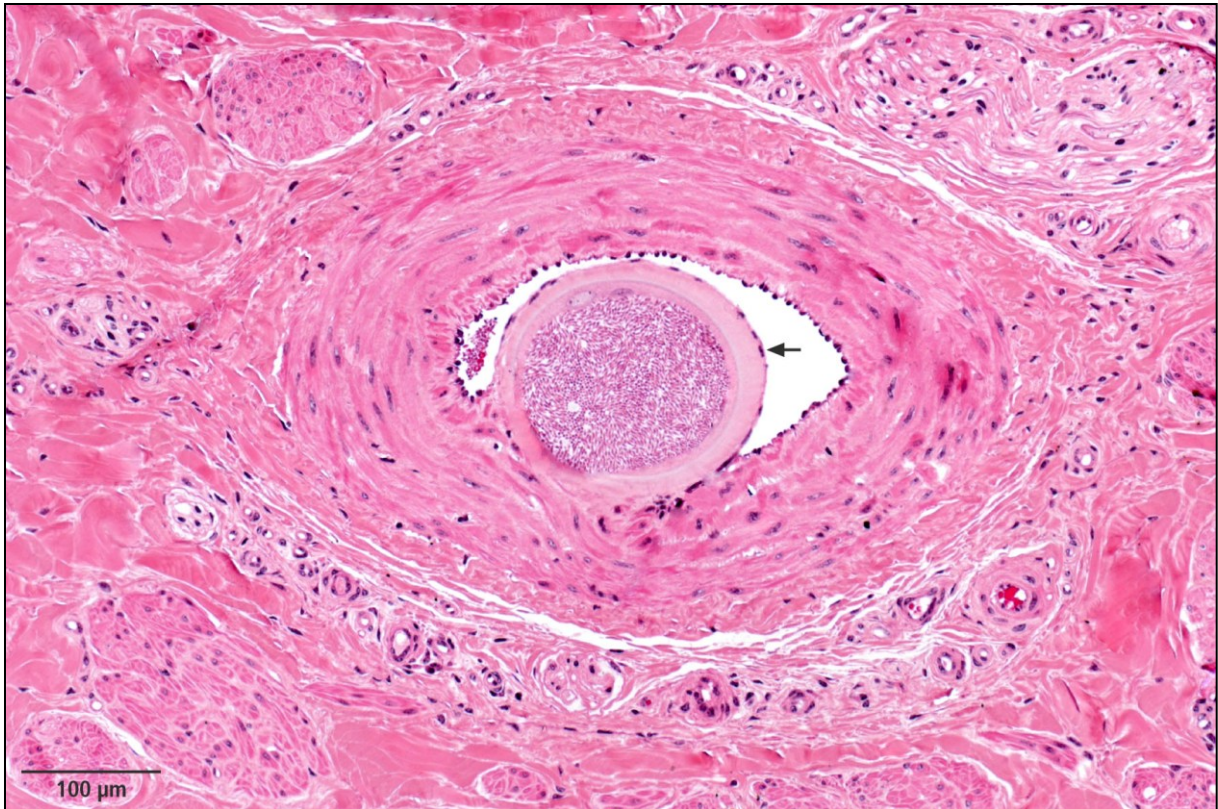


Abbildung IV-33: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zyste direkt unter dem Endothel (Pfeil) eines Gefäßes in der Zitze. Die Zyste ragt deutlich in das Gefäßlumen hinein und füllt dieses beinahe vollständig aus. GMA/MMA, HE.

2.3 Elektronenmikroskopische Befunde

2.3.1 Semidünnschnitte

Zusätzlich zu den Ergebnissen der GMA/MMA-Einbettung konnten in den Semidünnschnitten weitere Befunde erhoben werden. Im bläulich angefärbten Wirtszellzytoplasma befanden sich Ansammlungen von rötlich-orangem, homogenem Material, das sich einerseits frei im Zytoplasma befand, sich andererseits schichtartig der Membran der parasitophoren Vakuole anlegte. Innerhalb der parasitophoren Vakuole waren vor allem in der Peripherie die Bradyzoiten noch vital, zentral waren ihre äußeren Strukturen verwischt und undeutlich. Die in der HE-Färbung als grünlich angesprochenen Korpuskeln stellten sich hier rötlich-orange dar.

2.3.2 Ultrastruktur der Zysten

Gewebezysten von VT20 und VT22 wurden im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Die Zysten waren umgeben von überwiegend mononukleären Zellen und eosinophilen Granulozyten; um manche Zysten legte sich eine spindelzellige Schicht.

Von außen nach innen konnten vier Schichten voneinander unterschieden werden: erstens eine äußere zellfreie Schicht, die aus Kollagenfibrillen bestand; zweitens eine lockere Schicht, drittens die Wirtszelle und viertens die Wand der parasitophoren Vakuole, die zahlreiche Bradyzoiten beinhaltete (siehe **Abbildung IV-34**, S. 121 und **Abbildung IV-35**, S. 122).

Die äußere zellfreie Schicht wird auch äußere oder sekundäre Zystenwand genannt. Die wirtszellnahen Kollagenfibrillen zeigten eine zirkuläre dem runden Erscheinungsbild der Wirtszelle entsprechende Anordnung. Die Kollagenfibrillen in der Peripherie waren häufig lose und unstrukturiert angeordnet. Befanden sich Entzündungszellen in der Zystenperipherie, waren die Kollagenfibrillen der äußeren Zystenwand meist durchsetzt von Zytoplasma-Ausläufern der umgebenden Zellen.

Die zwischen Wirtszelle und äußerer Zystenwand liegende lockere, zellfreie Schicht war nicht immer eindeutig nachweisbar. Sie entsprach der in der HE-Färbung grünlich wirkenden Schicht und enthielt zahlreiche Proteoglykankörperchen sowie locker verteilte, feine Filamente.

Die Wirtszelle bestand aus einer einzigen Zelle mit mehreren hypertrophierten Zellkernen. Die Wirtszellmembran befand sich in direktem Kontakt mit der äußeren Zystenwand und zeigte zahlreiche Einfaltungen sowie kurze Ausstülpungen, die in die Kollagenschicht hineinragten, stellenweise gab es auch größere fingerförmige Ausstülpungen des Zytoplasmas in die hyaline Schicht. Die Kerne der Wirtszelle waren von beträchtlicher Größe, überwiegend spindelförmig, abschnittsweise mit tiefen Einfaltungen der Kernmembran und zeigten typische Merkmale von Zellkernen wie mehrere Poren und eine doppelte Membran. Im Zytoplasma der Wirtszelle befanden sich zahlreiche Mitochondrien, Lysosomen und Schläuche des rauen Endoplasmatischen Retikulums.

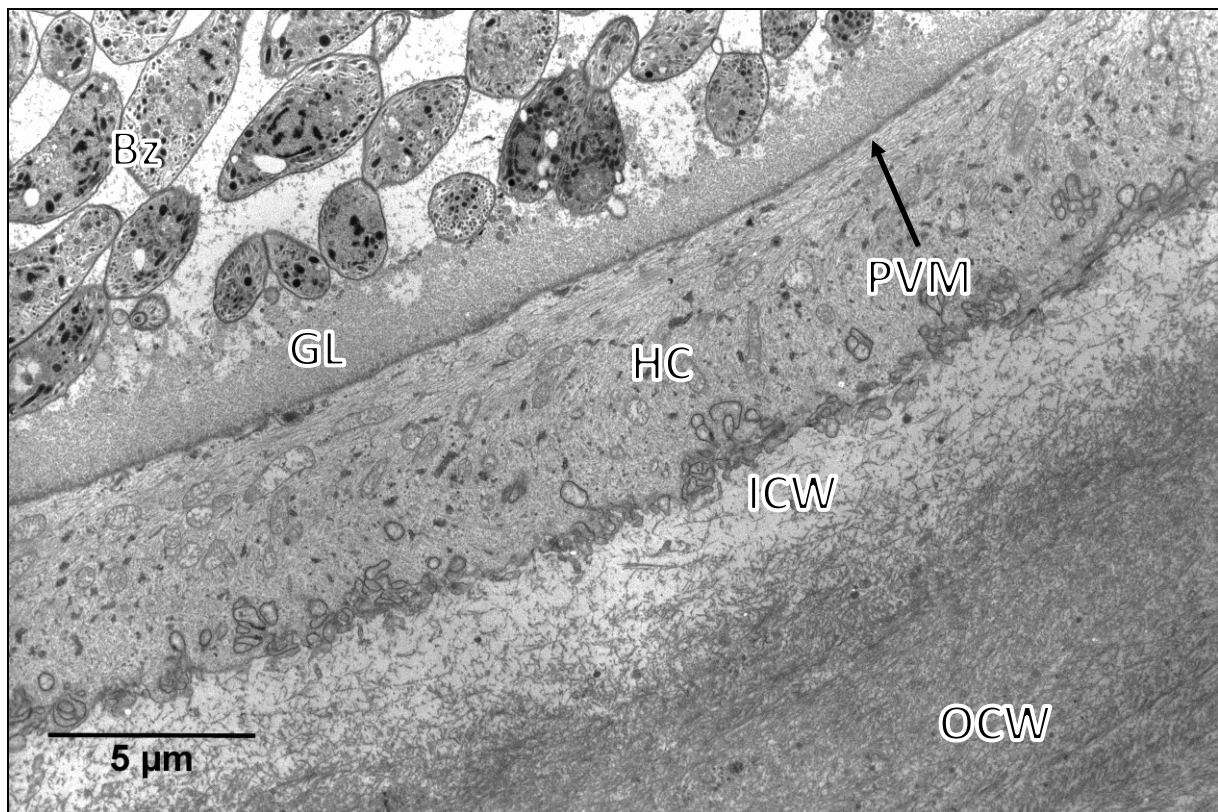


Abbildung IV-34: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Ultrastruktur der Zystenwand, von außen nach innen: äußere Zystenwand (OCW), innere Zystenwand (ICW), Wirtszellzytoplasma (HC), Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) mit lumenseitig anliegender granulärer Schicht (GL) und in der parasitophoren Vakuole liegenden Bradyzoiten (Bz). TEM.

Viele Mitochondrien wiesen Anzeichen von Degenerationen auf, wie beispielsweise Anschwellen, Desorganisation der *Cristae* oder Ruptur der mitochondrialen Membran. Des Weiteren fand sich im Zytoplasma granuläres elektronendichtes Material, das häufig direkt der Wand der parasitophoren Vakuole anlag und diese abschnittsweise schichtartig bedeckte. Dieses Material entsprach dem im Semidünnschnitt gefundenen intrazytoplasmatischen, rötlichen Material. In mehreren Lokalisationen war das Wirtszellzytoplasma in die parasitophore Vakuole eingestülpt.

Die parasitophore Vakuole war meistens kugelförmig und zeigte eine glatte Membran. In manchen Abschnitten war die Kontur der parasitophoren Vakuole unregelmäßig mit wellenförmiger Membran. Die Wand der parasitophoren Vakuole wurde aus einer Membran gebildet, der lumenseitig eine abschnittsweise sehr dicke granuläre Schicht anlag. Abschnittsweise bildete diese Schicht straßenartige Ausläufer, die quer durch die parasitophore Vakuole zogen. Mehrere vesikuläre Strukturen lagen auf der Innenseite der

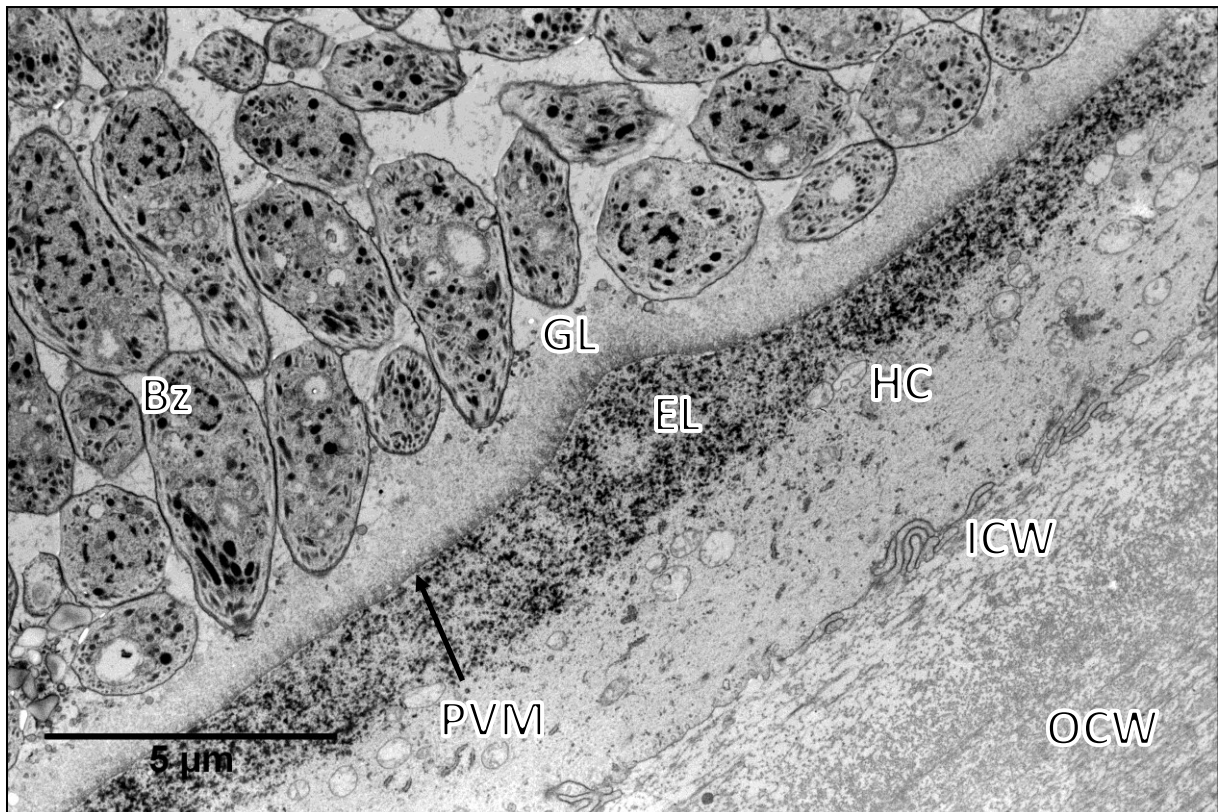


Abbildung IV-35: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Ultrastruktur der Zystenwand, von außen nach innen: äußere Zystenwand (OCW), dünne innere Zystenwand (ICW), Wirtszellzytoplasma (HC), Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) mit außen anliegender elektronendichter Schicht (EL) und lumenseitig anliegender granulärer Schicht (GL) und in der parasitophoren Vakuole liegenden Bradyzoiten (Bz). TEM.

granulären Schicht. Zahlreiche intakte und degenerierende Bradyzoiten befanden sich in der parasitophoren Vakuole, in einzelnen Abschnitten konnten noch Endodyogenie-Stadien beobachtet werden.

In degenerierten Zysten konnten im Wirtszellzytoplasma keine Organellen mehr identifiziert werden, die Membran der parasitophoren Vakuole war nur undeutlich vorhanden und von den in der parasitophoren Vakuole liegenden degenerierten Bradyzoiten konnte nur noch die membranöse Umhüllung identifiziert werden.

2.3.3 Ultrastruktur der Bradyzoiten

Die Zystozoiten waren von komma- oder bananenförmiger Gestalt mit zugespitztem anterioren und abgerundetem posterioren Ende und zeigten typische Merkmale von Kokzidien-Bradyzoiten: eine drei-schichtige Umhüllung (Pellicle), Mikropore, Konoid, Rhoptrien, Mikronemen, Mitochondrium, dichte Granula, Lipidkörper, Apicoplast und

Amylopektingranula (siehe **Abbildung IV-36**). Elf länglich geschnittene, zur Vermessung herangezogene Bradyzoiten waren $1,4-2,0 \times 5,1-7,4 \mu\text{m}$ groß.

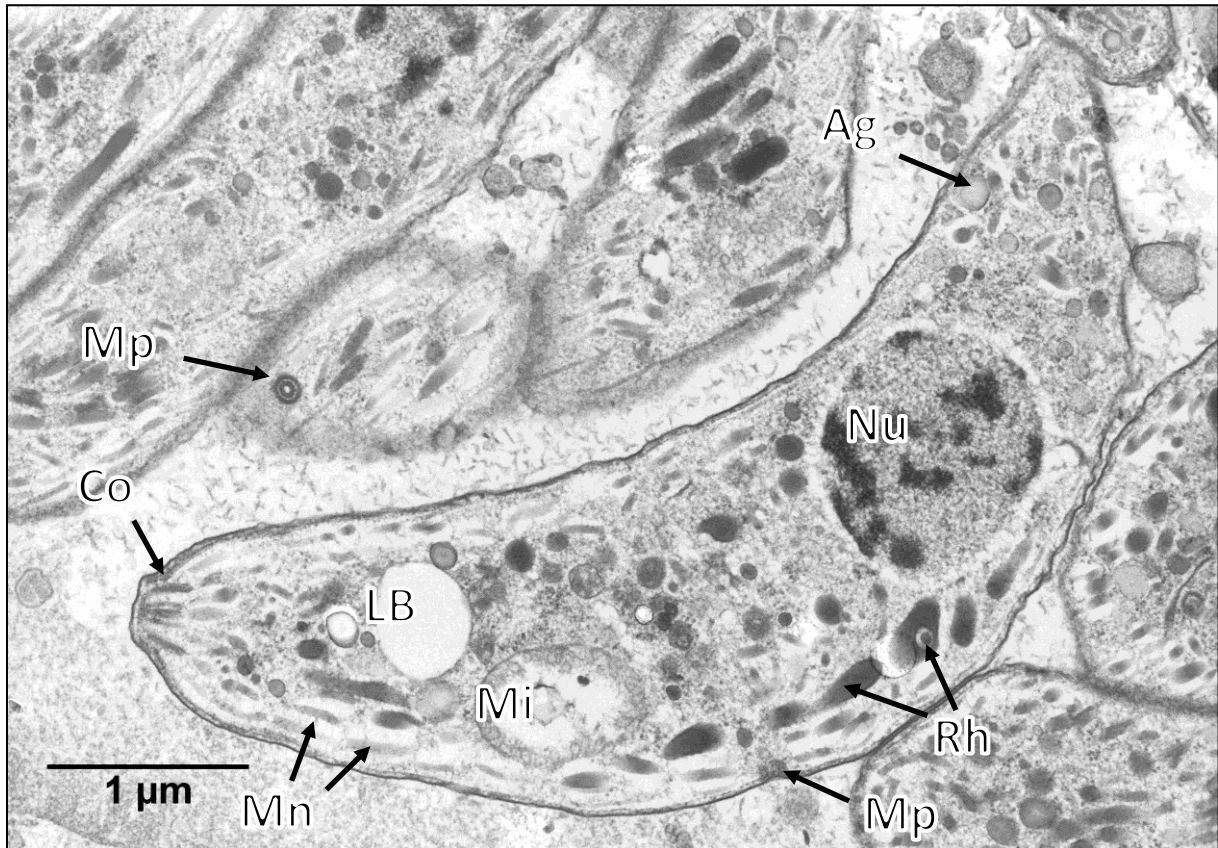


Abbildung IV-36: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Bradyzoit von *B. besnoiti*. Co, Konoid; LB, Lipidkörperchen; Mi, Mitochondrium; Mn, Mikronemen; Mp, Mikropore; Ag, Amylopektingranulum; Nu, Nukleus; Rh, Rhoptrien, TEM.

Die äußere Schicht des Pellicle umgab den gesamten Parasiten, die innere Schicht, bestehend aus zwei Membranen, war an Mikroporen und am vorderen Ende des Bradyzoiten unterbrochen und bildete einen polaren Ring. Vom polaren Ring aus erstreckten sich 22 subpellikuläre Mikrotubuli nach posterior. Am anterioren Ende der Parasiten befanden sich das Konoid mit zwei aufliegenden apikalen Ringen (siehe **Abbildung IV-37**, S. 124), zahlreiche Mikronemen sowie lange keulenförmige Rhoptrien, die bis zur Hälfte der Bradyzoiten reichten. Bis zu fünf Rhoptrien und bis zu 40 Mikronemen wurden in einzelnen Bradyzoiten gezählt.

Der Zellkern war in der posterioren Hälfte der Bradyzoiten lokalisiert, anterior davon befanden sich ein tubulär gestrecktes Mitochondrium und der Golgi-Komplex. Die Mikropore wurde durch eine Einstülpung der äußeren Pellicle-Membran gebildet, mit einer der

Mikropore außen anliegenden elektronendichten zylindrischen Struktur (siehe **Abbildung IV-36**, S. 123).

In mehreren Bradyzoiten war ein elektronendichtes granuliertes Material zu finden, das sich häufig zu Clustern zusammenballte. Manche der Bradyzoiten waren eher rundlich und hatten ihre typische Form verloren. Bradyzoiten, die dieses Material enthielten, zeigten häufig keine klar erkennbaren Organellen und Zellkerne. Das Material ersetzte mitunter Teile von typischen Bradyzoiten-Strukturen, wie beispielsweise Mikronemen oder Rhoptrien.

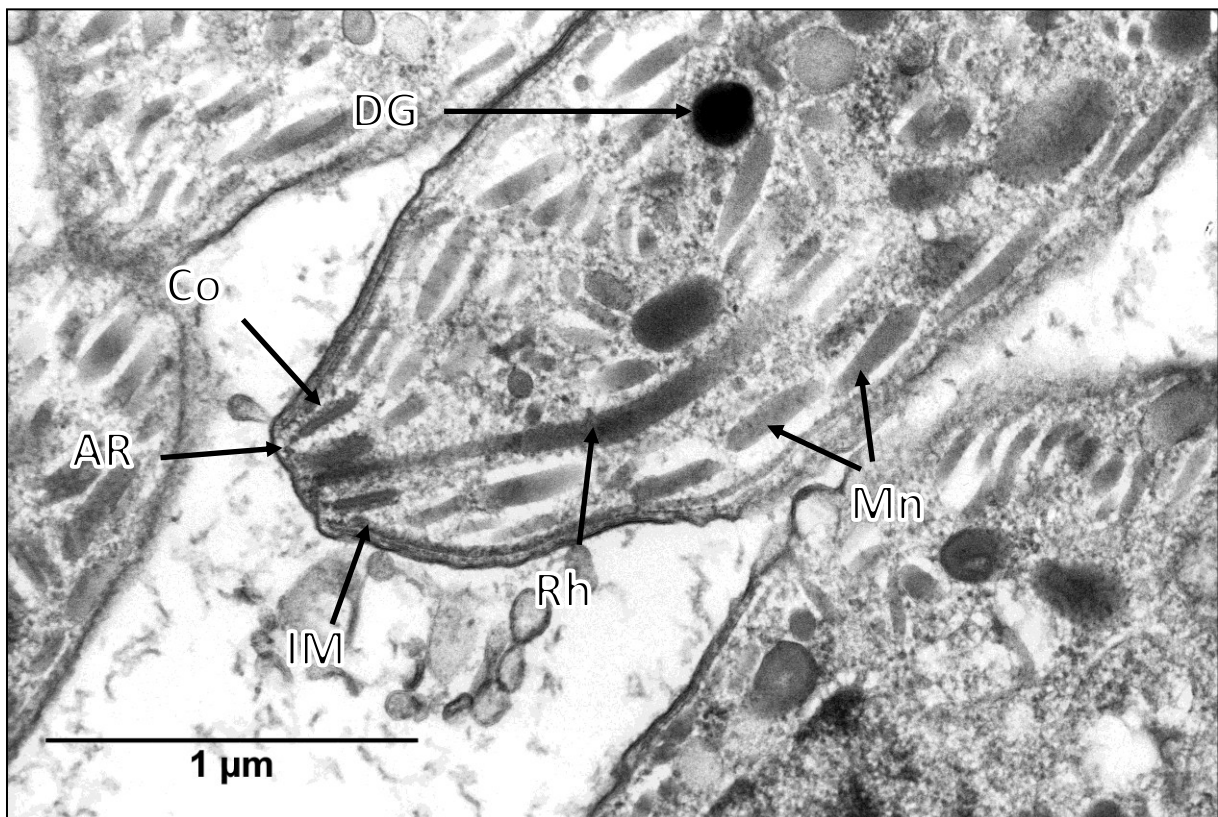


Abbildung IV-37: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Anteriores Drittel eines Bradyzoiten. AR, apikale Ringe; Co, Konoid; DG, dichtes Granulum; IM, innerer Membrankomplex; Mn, Mikronemen; Om, äußerer Membrankomplex; Rh, Rhoptrie. TEM.

Mitunter konnten überhaupt keine Organellen mehr gefunden werden, und es fanden sich nur noch membranumgrenzte Cluster von elektronendichtem Material (siehe

Abbildung IV-38, S. 125). Das gleiche elektronendichte Material konnte auch frei zwischen den Bradyzoiten liegend aufgefunden werden. In einer Lokalisation konnten neben den intraparasitären Clustern ein Mitochondrium mit aufgelösten Membranen und Verlust der intramitochondrialen *Cristae* nachgewiesen werden (siehe **Abbildung IV-39**, S. 126).

Abschnittsweise konnten aufgeblähte Bradyzoiten gefunden werden, deren Zytoplasma von hellen, blasig wirkenden Strukturen eingenommen war. Manche Bradyzoiten waren aufgeplatzt und zeigten einen Verlust von Organellen ohne dass intrazytoplasmatische elektronendichte Granula auffindbar waren.

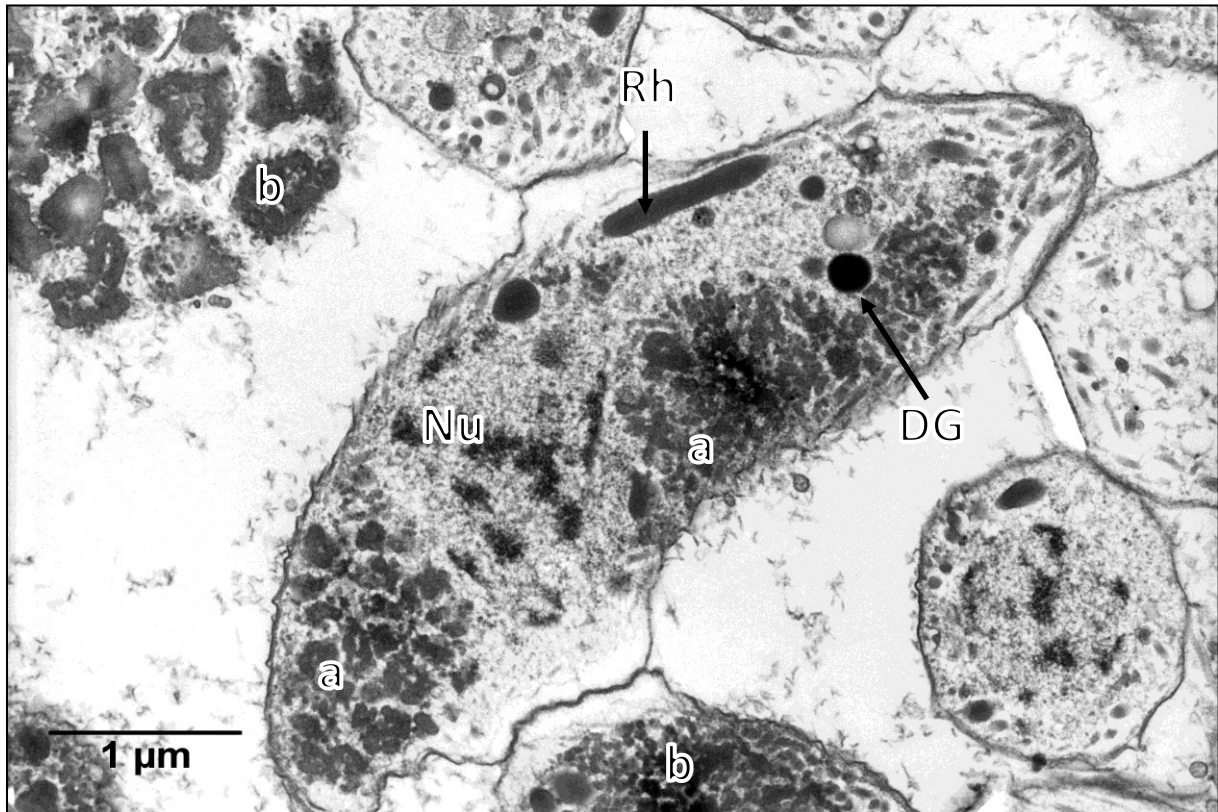


Abbildung IV-38: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Bradyzoit mit intrazytoplasmatischen Ansammlungen von elektronendichtem, granulärem Material (a) und Verlust von Organellen. Daneben befinden sich sowohl membranumgrenzte als auch frei liegende Ansammlungen desselben Materials (b). DG, dichtes Granulum; Nu, Nukleus; Rh, Rhoptrie. TEM.



Abbildung IV-39: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Degenerierender Bradyzoit mit Ansammlungen von elektronendichtem, intrazytoplasmatischem Material und Mitochondrium mit Auflösung der Membran (Mi). Daneben ein membranumgrenzter Cluster von elektronendichtem Material (a). TEM.

3 GKO-Mäuse

3.1 Histologie

B. besnoiti-Tachyzoiten konnten mittels Immunhistochemie in zahlreichen Organen nachgewiesen werden: Haut, Unterhaut, Skelettmuskulatur, Knochen und Knochenmark, Auge, Gehirn, Lunge, Herz, Magen-Darm-Trakt inklusive Lymphknoten und Gekröse, Leber, Pankreas, Milz, Nieren, Nebennieren, Hoden, Ovarien und Uterus. In den meisten Fällen befanden sich die Parasiten intraendothelial. Jedoch waren Tachyzoiten auch in Hepatozyten, Leukozyten, Peritonealdeckzellen und frei innerhalb von Gefäßen nachweisbar. In nicht vaskularisierten Organen wie Kornea, Knorpel oder Epithelien konnten keine Parasitenstadien nachgewiesen werden.

In der HE-Färbung stellten sich die Parasiten als bananenförmige, violette Strukturen dar, die in den meisten Fällen intrazellulär in Trauben oder Stauden von bis zu zwölf Tachyzoiten angeordnet waren. Massive fokale Parasiten-Ansammlungen innerhalb einer Endothelzelle führten zu einer auffälligen Protrusion des Zelleibes in das Gefäßlumen (siehe **Abbildung IV-40**). Innerhalb der Gefäße waren Tachyzoiten einzeln oder in rosettenförmigen Strukturen frei im Lumen auffindbar. In der PAS-Reaktion war der Parasitenleib an sich von blass-violetter Farbe. Nur einzelne granuläre Elemente innerhalb der Endozoiten reagierten positiv (siehe **Abbildung IV-41**, S. 128).

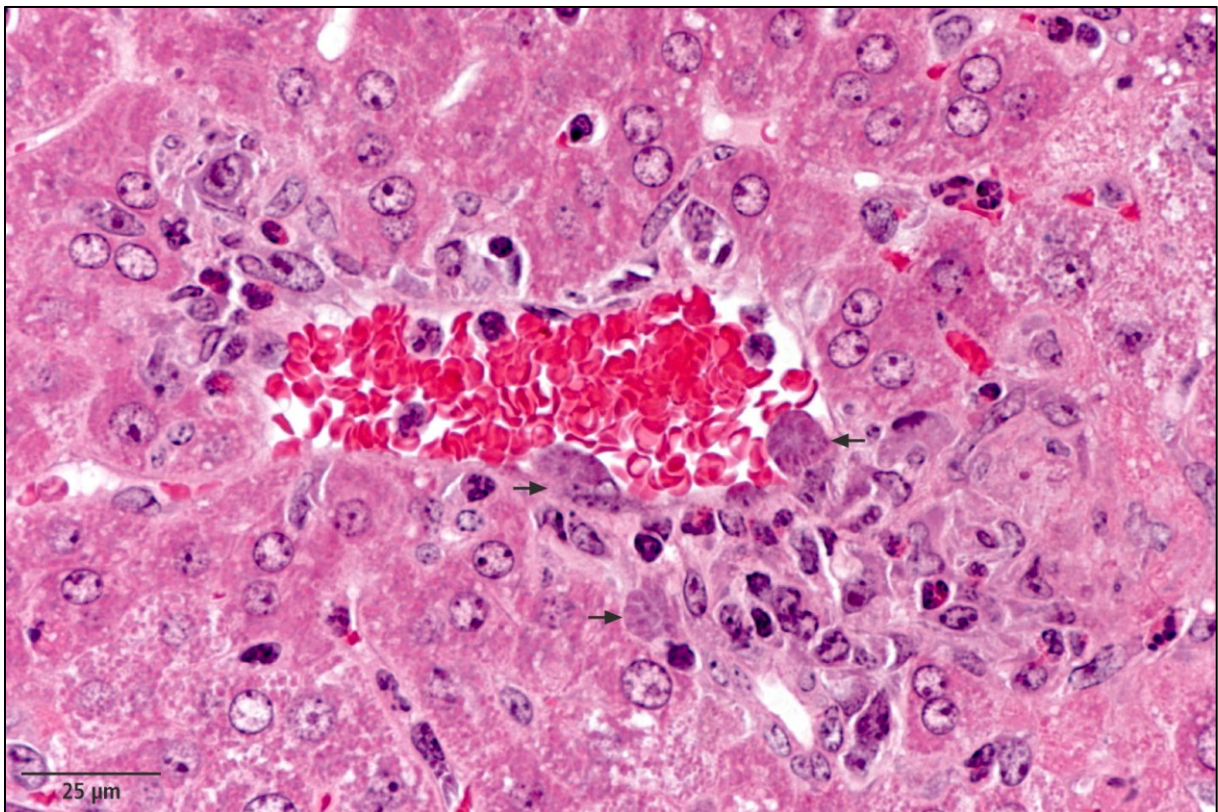


Abbildung IV-40: GKO-Maus, akutes Stadium (Leber): Zahlreiche Tachyzoiten mit Ausbildung von staudenartigen Formationen (Pfeile). GMA/MMA, HE.

Parasitenleib, Parasitenmembran und die Membran der parasitophoren Vakuole produzierten ein positives Signal in der Immunhistochemie. Bei höheren Verdünnungen des Primärantikörpers wurde das Signal des Parasitenleibes schwächer, wohingegen Signale aus der Membran des Tachyzoiten und der parasitophoren Vakuole immer noch erkennbar blieben.

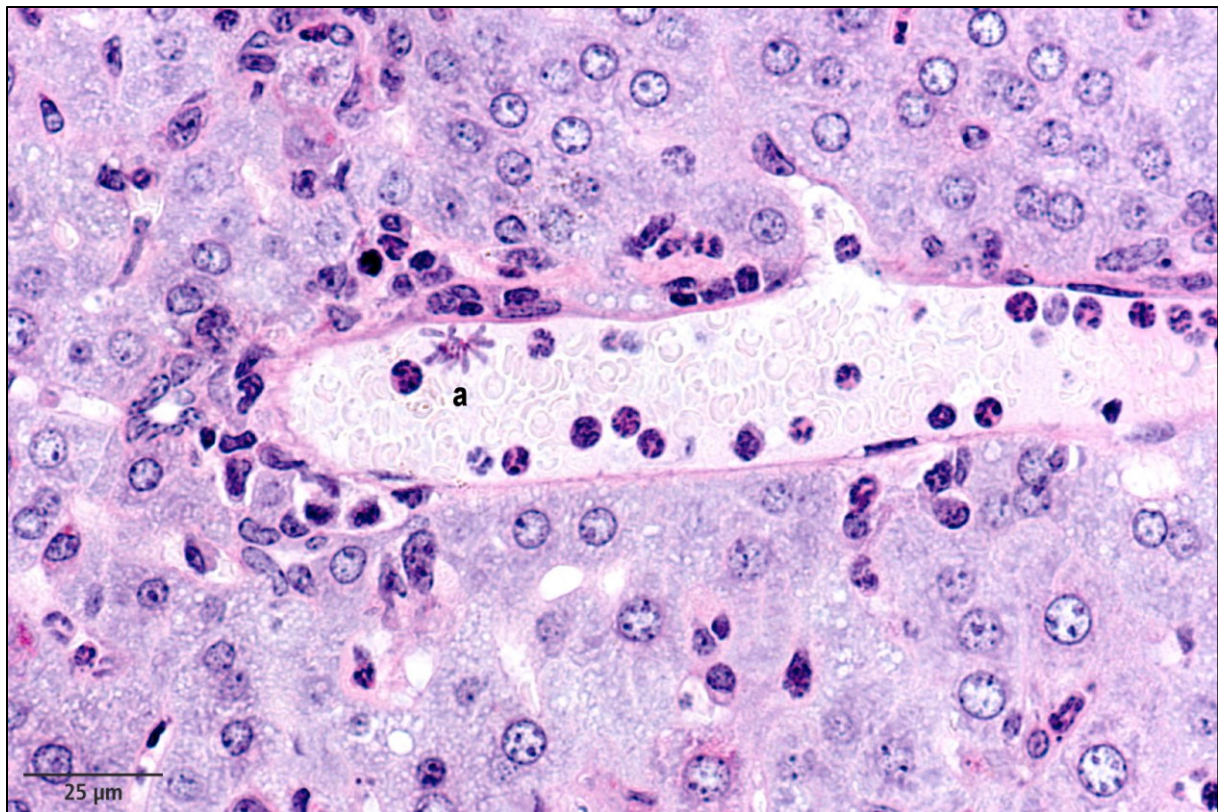


Abbildung IV-41: GKO-Maus, akutes Stadium (Leber): Intravasale Tachyzoiten in rosettenartiger Formation (a). Nur einzelne intrazytoplasmatische Elemente reagieren PAS-positiv. GMA/MMA, PAS-Reaktion.

Parasiten konnten einzeln innerhalb einer parasitophoren Vakuole nachgewiesen werden oder aber in Gruppen von bis zu ca. zwanzig Organismen. Größere Gruppen waren auch hier leicht anhand der typischen Ausbildung von Stauden erkennbar. Die Immunhistochemie erleichterte die Identifikation einzelner befallener Zellen erheblich. Parasiten waren verlässlich in großer Zahl in Leber und Lunge nachzuweisen, in anderen Organen war das Ausmaß des Befalls meistens geringer. Bei zwei Mäusen konnten nur einzelne wenige Parasiten intraendothelial nachgewiesen werden.

Die auffälligsten pathomorphologischen Organveränderungen waren Leberzellnekrosen, Peritonitis, interstitielle Pneumonie und akute Hämorrhagien in der Lunge. Diese Läsionen konnten bis auf wenige Ausnahmen bei allen Tieren in unterschiedlichen starken Ausprägungsgraden nachgewiesen werden.

In der Leber fanden sich multifokale, gering- bis mittelgradige Einzelzell- und Zellgruppennekrosen mit begleitender überwiegend neutrophil-granulozytärer Infiltration. In einzelnen Fällen waren nur solitäre Nekrosen und einzelne „apoptotic bodies“ auffindbar.

Die Lebern einzelner Mäuse Lebern zeigten darüber hinaus noch eine bis zu hochgradige feintropfige Vakuolisierung der Hepatozyten.

Peritonitische Läsionen waren vor allem im Bereich der Organgekröse zu finden. Die Serosa-Deckzellen zeigten eine hochgradige Aktivierung mit einer bis zu hochgradigen, diffusen, subserosalen, neutrophil-granulozytären, lymphoplasmazellulären und histiozytären Infiltration. In einzelnen Fällen waren zusätzliche akute, diffuse Hämorrhagien im subserosalen Fett- und Bindegewebe erkennbar.

Der Grad der interstitiellen Pneumonie war in den meisten Fällen geringgradig und zeigte sich durch verbreiterte pulmonale Alveolarsepten und eine geringgradige interstitielle Zellinfiltration. Hämorrhagien der Lunge waren multifokal verteilt, akut, von gering- bis mittelgradigem Ausmaß und intraalveolär und intrabronchiolär lokalisiert.

Weitere Läsionen, die bei einzelnen Tieren auftraten, waren eine fokale akute Nekrose von Pankreas-Azinus-Zellen. Bei einem Tier war das Myo- und Endokard fokal mit neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen infiltriert.

3.2 Elektronenmikroskopie

Tachyzoiten von *B. besnoiti* wurden intrazellulär in Endothelzellen, Hepatozyten und mehreren Leukozyten nachgewiesen. Sie befanden sich einerseits frei im Zytoplasma der Wirtszellen oder innerhalb einer parasitophoren Vakuole. Sehr häufig befanden sich mehrere Tachyzoiten innerhalb von Endothelzellen und bildeten traubenartige Formationen. Häufig wölbte sich der Zelleib, der die parasitophore Vakuole enthielt, in das Gefäßlumen hinein.

Typische Merkmale von Kokzidien-Tachyzoiten wie dreischichtige Umhüllung (Pellicle), Konoid, Rhoptrien, Mikronemen, Mitochondrion, Mikropore, Amylopektingranula, Apicoplast, endoplasmatisches Retikulum und dichte Granula wurden nachgewiesen.

Tachyzoiten besaßen ein zugespitztes anteriores Ende, an dem sich das Konoid und die Ausführungsgänge der Rhoptrien befanden und ein abgerundetes posteriores Ende.

Tachyzoiten waren von plumper, birnenförmiger Gestalt. Sechs zur Vermessung herangezogene, annähernd longitudinal geschnittene Tachyzoiten hatten eine Größe von 1,3-1,7 µm × 4,0-5,2 µm.

Die dreischichtige Umhüllung bestand aus einer äußeren komplett durchgängigen Membran und einer inneren aus zwei Membranen bestehenden Schicht, die am hinteren und am vorderen Ende unterbrochen war und dort einen polaren Ring bildete. Vom polaren Ring aus erstreckten sich 22 Mikrotubuli subpellikulär nach posterior. Der Zellkern war im posterioren Teil des Parasiten lokalisiert und in seiner Umgebung befand sich das Netzwerk des Endoplasmatischen Retikulums und das langgestreckte, schlauchförmige Mitochondrium, das vom hinteren Ende des Parasiten bis in das vordere Drittel reichte (siehe **Abbildung IV-42**).

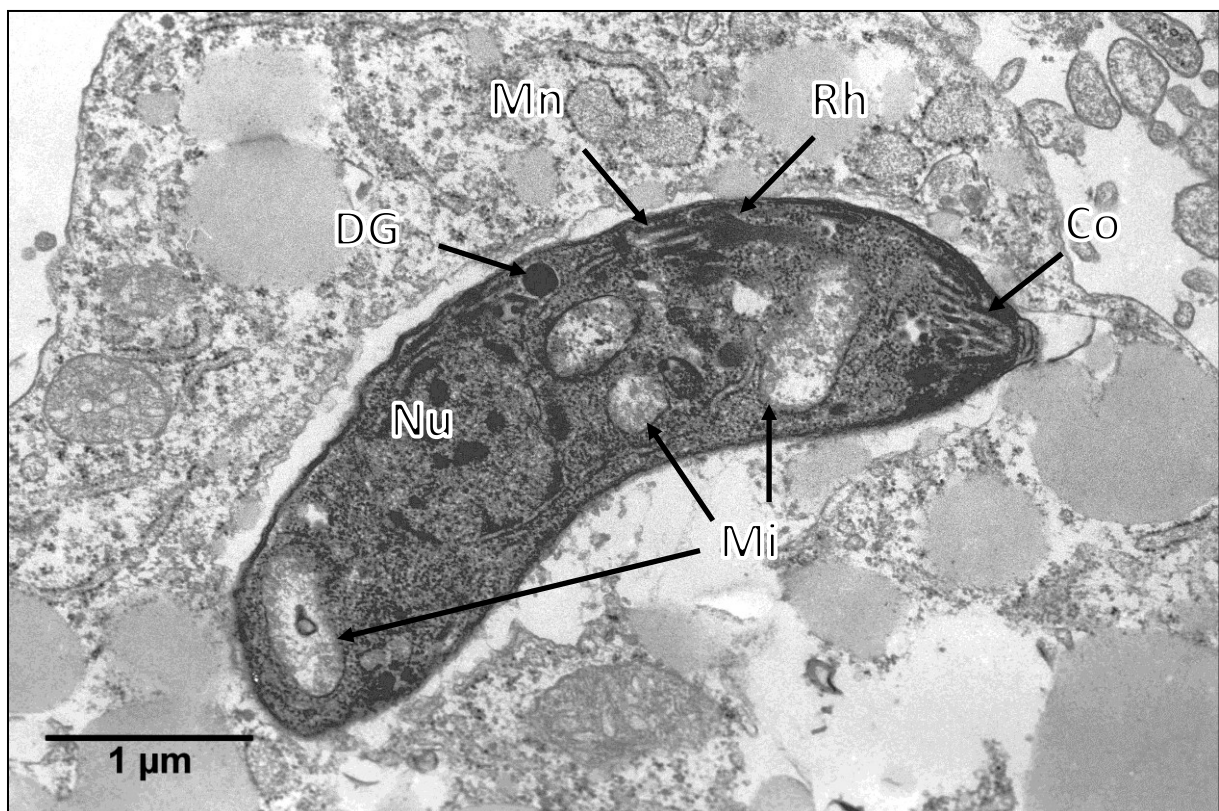


Abbildung IV-42: GKO-Maus, Tachyzoit von *B. besnoiti* mit mehreren Anschnitten des lang gestreckten, tubulären Mitochondriums (Mi). Co, Konoid; DG, elektronendichtes Granulum; Mn, Mikronemen; Nu, Nukleus; Rh, Rhoptries. TEM.

Zahlreiche Parasiten befanden sich in den unterschiedlichen Stadien der Endodyogenie (siehe **Abbildung IV-43**). Sowohl intrazellulär als auch extrazellulär konnte eine Rosettenbildung beobachtet werden, die dadurch entstand, dass mehrere Parasiten an ihrem posterioren Ende noch über einen Residualkörperchen miteinander verbunden waren. Häufig enthielt das Residualkörperchen mehrere Amylopektingranula (siehe **Abbildung IV-44**, S. 132).

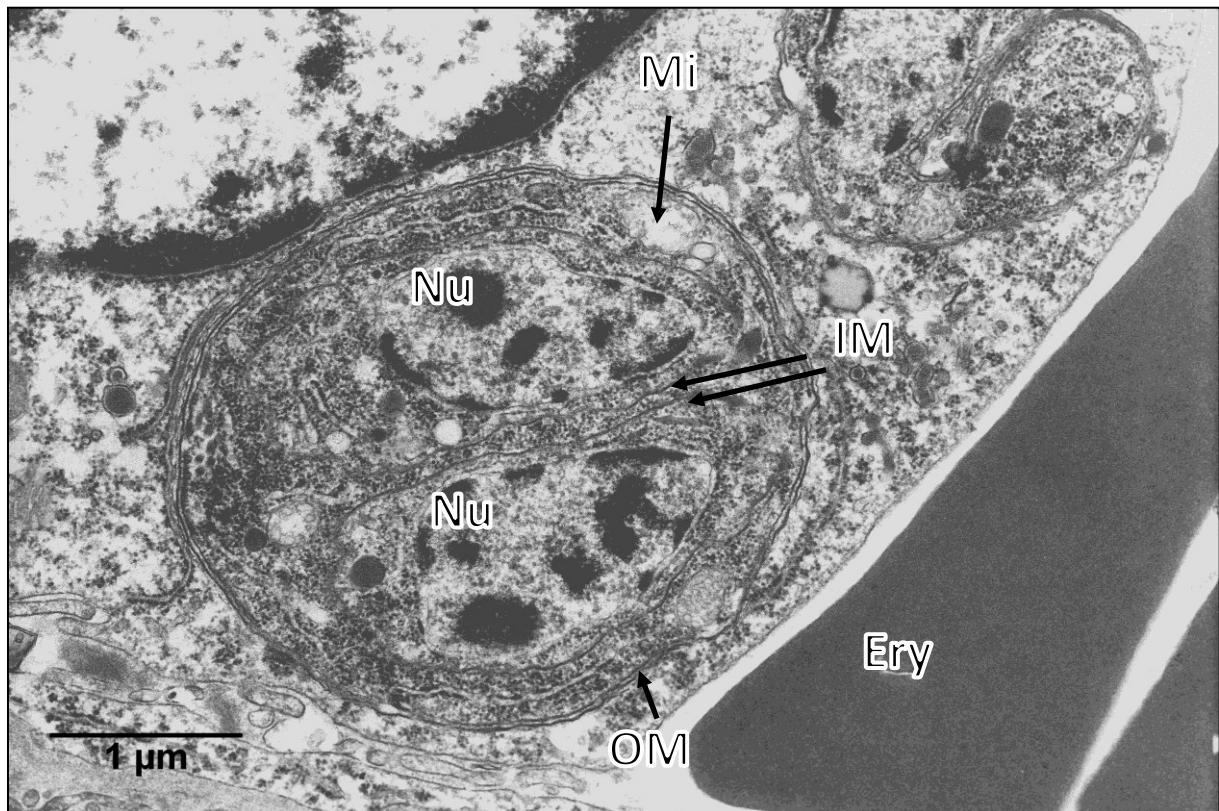


Abbildung IV-43: GKO-Maus, Endodyogenie-Stadium im Wirtszellzytoplasma, am rechten oberen Rand befinden sich zwei Tachyzoitenanschnitte, die noch über ein Residualkörperchen miteinander verbunden sind. Ery, Erythrozyt; IM, Membran der Tochter-Merozoiten; Mi, Mitochondrium des Mutter-Merozoiten; Nu, Nuklei der Tochter-Merozoiten; OM, äußere Membran des Mutter-Merozoiten. TEM.

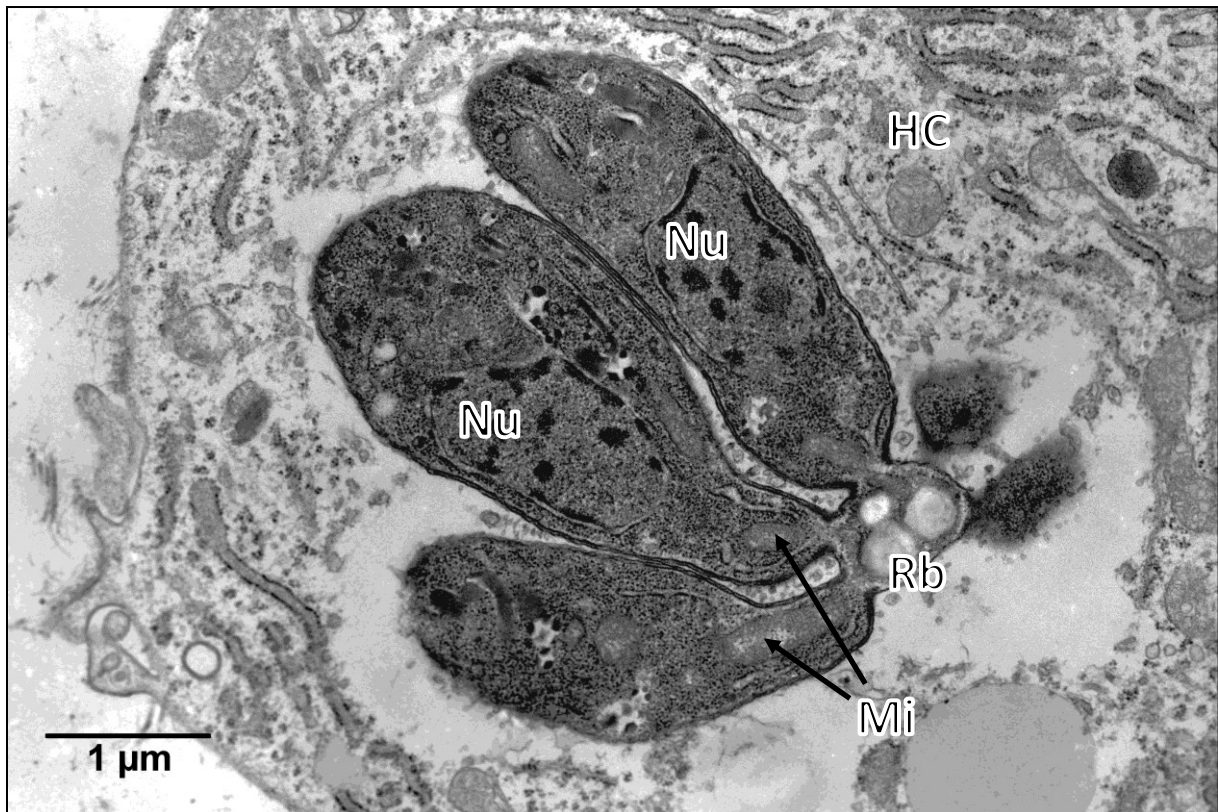


Abbildung IV-44: GKO-Maus, drei Tachyzoiten von *B. besnoiti* im finalen Stadium der Endodyogenie. Die Tachyzoiten sind am posterioren Ende über ein Residualkörperchen noch miteinander verbunden. HC, Wirtszelle; Mi, Mitochondrien; Nu, Nukleus; Rb, Residualkörperchen mit mehreren Amylopektingranula. TEM.

Die Wirtszellinvasion von *B. besnoiti* konnte beobachtet werden. Eine aktive Penetration mit Bildung einer „moving junction“ und einer sanduhrförmigen Einengung des Parasitenleibes konnte bei der Invasion einer Endothelzelle in der Haut nachgewiesen werden. Bei anderen Parasiten fehlte die Einengung des Parasitenleibes, stattdessen gingen von der Wirtszelle Pseudopodien aus und begannen den Parasiten in eine Vakuole einzuschließen (siehe **Abbildung IV-45**, S. 133).

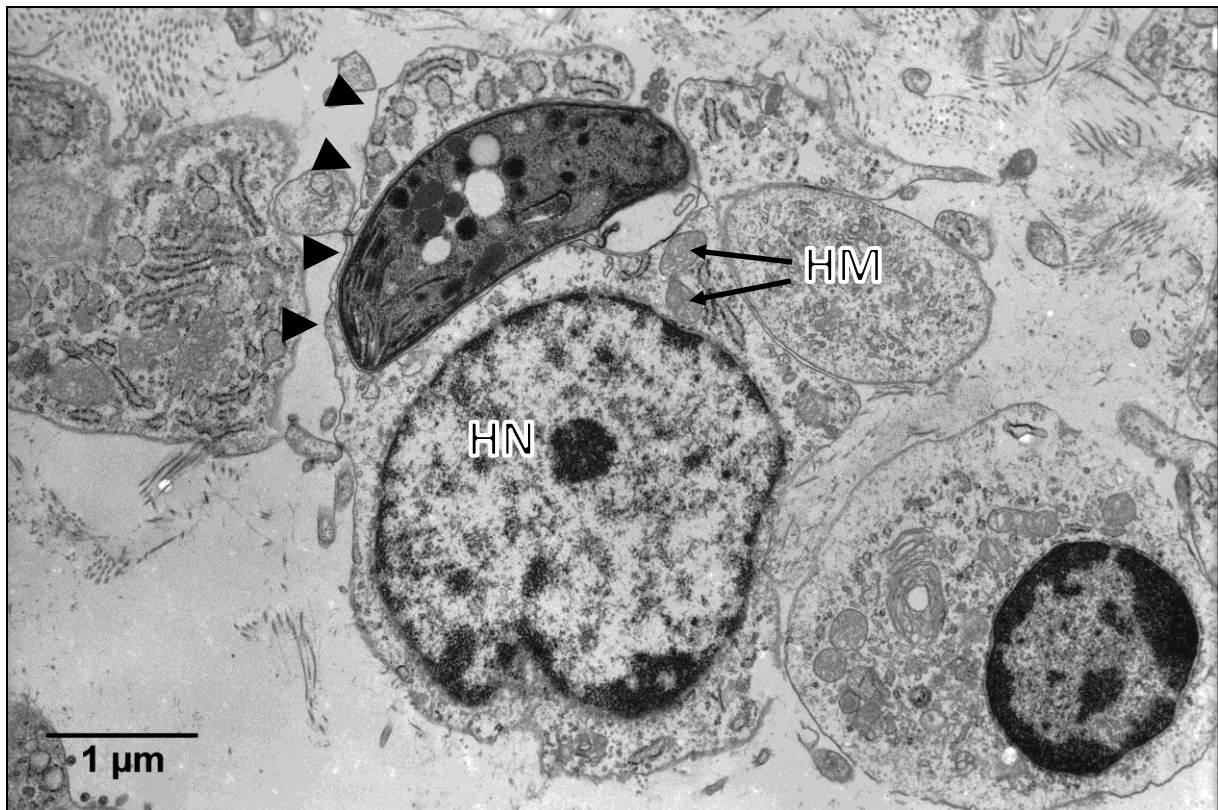


Abbildung IV-45: GKO-Maus, Phagozytose eines Tachyzoiten von *B. besnoiti*. Pseudopodienartige Zytoplasma-Ausläufer (Pfeilspitzen) umschließen den Parasiten. Hinweise auf einen aktiven Eindringprozess wie sanduhrförmige Einschnürung des Parasitenleibes und Ausbildung einer „moving junction“ fehlen. HM, Mitochondrien der phagozytierenden Zelle; HN, Zellkern der phagozytierenden Zelle. TEM.

4 Immunhistochemie

4.1 Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie

In der Verdünnung von 1:2000 konnten sowohl Tachyzoiten in der Rinderhaut und in Organen von GKO-Mäusen als auch Bradyzoiten dargestellt werden. Parasitenleib, Parasitenmembran und parasitophore Vakuole reagierten positiv.

In der Negativkontrolle (polyklonales Kaninchenantiserum gegen *E. coli*) konnte in Tachyzoiten und Bradyzoiten kein positives Signal nachgewiesen werden.

In angegebener Verdünnung konnten bei Tachyzoiten von *T. gondii* und *N. caninum* keine positiven Reaktionen festgestellt werden. Bradyzoiten von *T. gondii* reagierten negativ.

Bradyzoiten von *N. caninum* zeigten ein geringgradiges, feines Signal in einer Verdünnung von 1:1000 was bei der höheren Verdünnung nicht auftrat. Ein ähnlich feines, geringgradiges Signal konnte auch in *Sarcocystis*-Gewebezysten bei einer Verdünnung von 1:2000 gefunden werden.

Trotz unterschiedlicher Vorbehandlung, Antigen-Demaskierung und Antikörper-Verdünnung konnten Tachyzoiten von *B. besnoiti* im Semidünnschnitt immunhistochemisch nicht dargestellt werden.

Ein geringgradiges, positives, vornehmlich membranständiges Signal wurde sowohl bei Tachyzoiten in der Leber der Maus, als auch bei Bradyzoiten innerhalb von Zysten in der Rinderhaut mittels Kunststoff-Immunhistochemie detektiert. Die Intensität des Signals war jedoch im Vergleich zu den Signalen aus der Paraffin-Immunhistochemie deutlich geringer.

4.2 Immunhistochemie zellulärer Marker

Um die entzündliche Reaktion in der Zystenumgebung genauer zu typisieren, wurden die Lymphozyten-Marker anti-CD3 (T-Lymphozyten-Marker) und anti-CD20 (B-Lymphozyten-Marker) und der Makrophagen-Marker anti-Histiozyten-Antigen (Klon MAC387) verwendet.

Um die Wirtszelle näher zu typisieren, wurden oben genannter Makrophagen-Marker und ein Antikörper gegen das Intermediär-Filament mesenchymaler Zellen (anti-Vimentin) verwendet.

Es zeigte sich, dass die perizystische Lymphozyten-Infiltration zum großen Teil aus T-Lymphozyten bestand (siehe **Abbildung IV-46**, S. 135) Nur wenige B-Lymphozyten konnten in der Zystenumgebung gefunden werden (siehe **Abbildung IV-47**, S. 135).

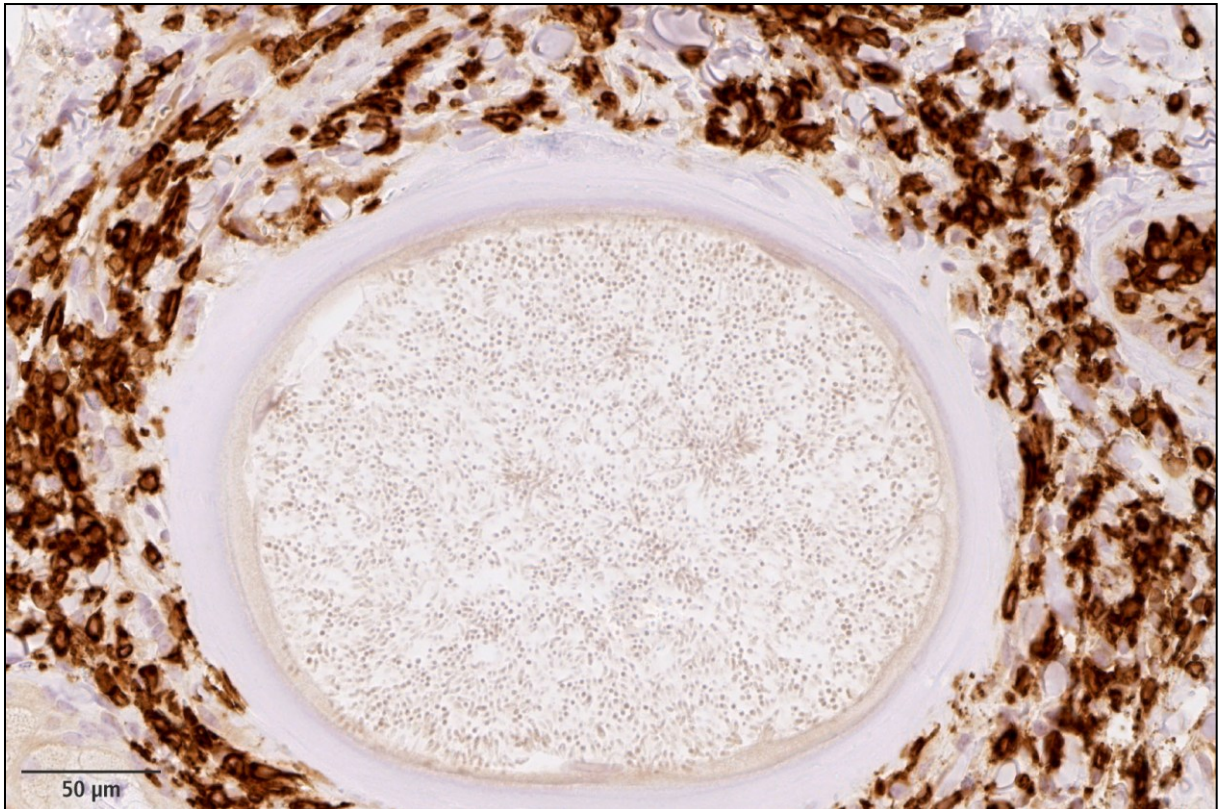


Abbildung IV-46: VT20, Chronisches Stadium (Tag 68): T-Zell-reiches Infiltrat in der Umgebung einer Zyste (braunes Signal). Paraffin, Anti-CD3, Hämalan.

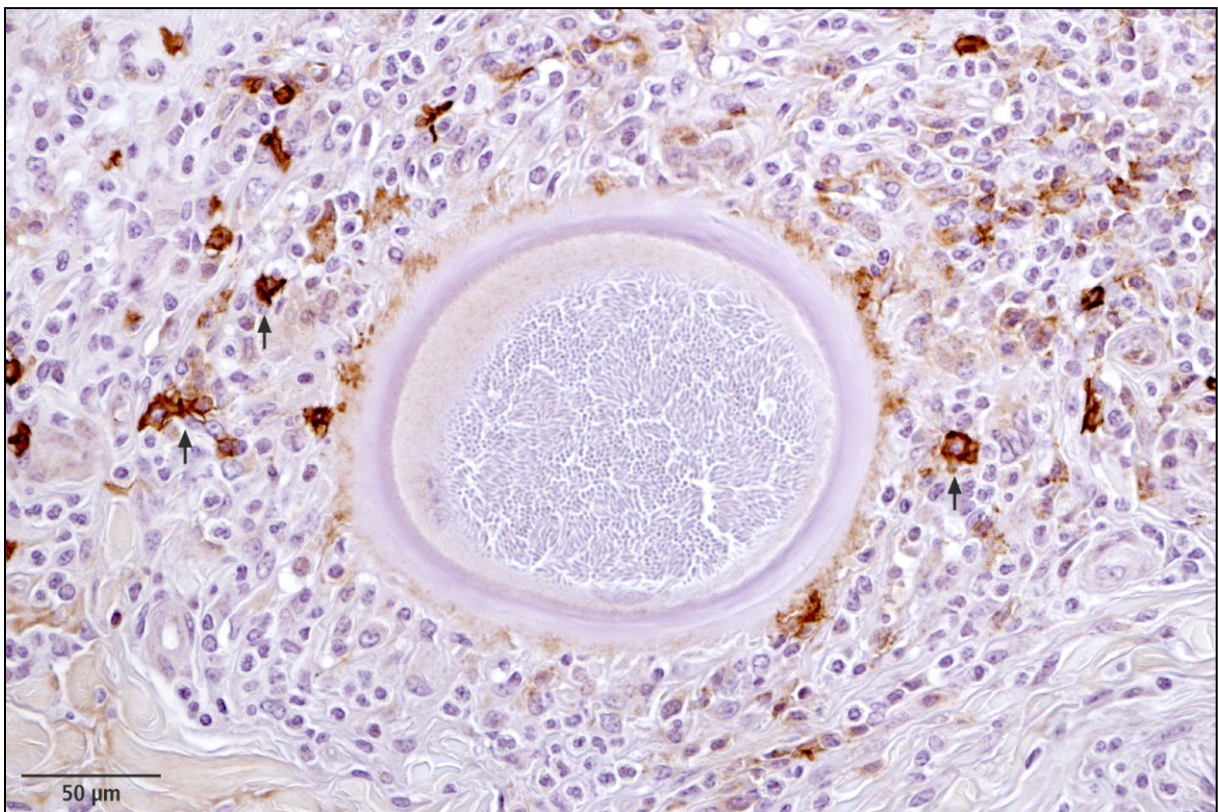


Abbildung IV-47: VT22, Chronisches Stadium (Tag 189): In den hochgradigen perizystischen Zellinfiltrationen finden sich nur wenige B-Zellen (Pfeile). Paraffin, Anti-CD 20, Hämalan.

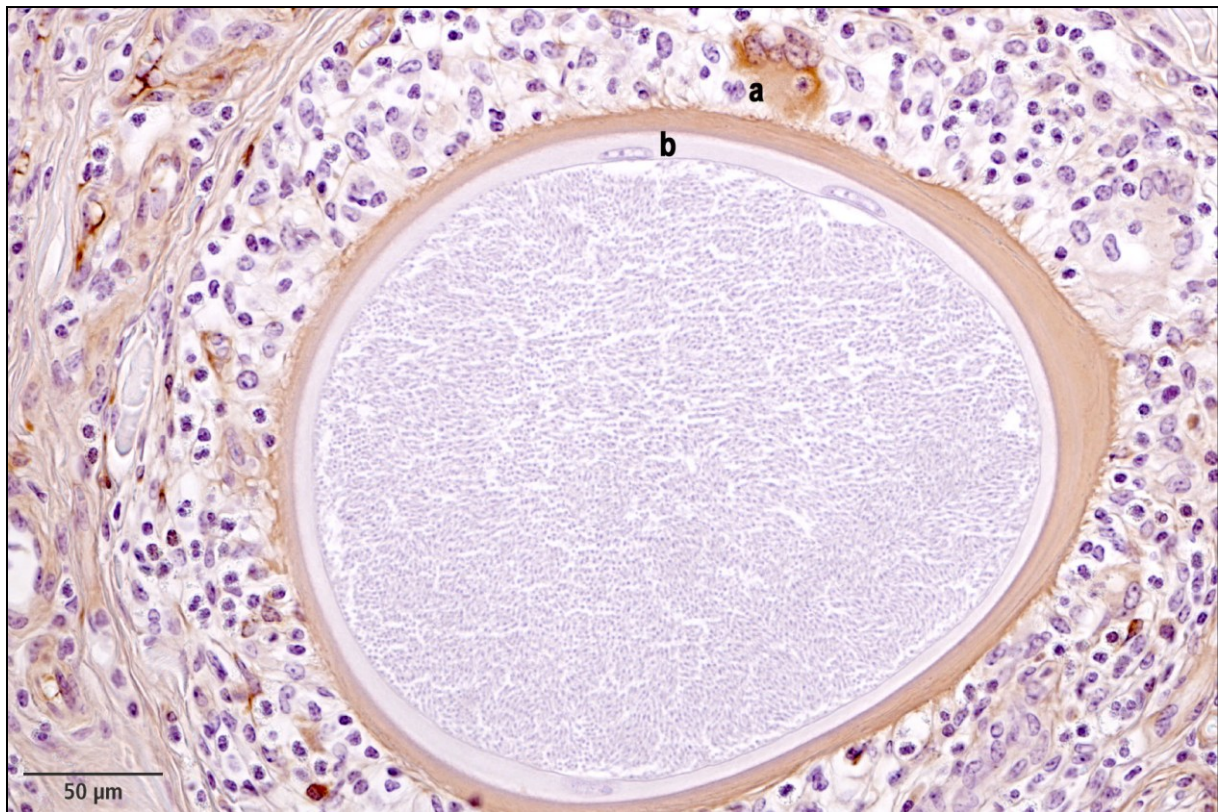


Abbildung IV-48: VT20, Chronisches Stadium (Tag 293): Immunhistochemische Darstellung von Makrophagen. Eine mehrkernige Riesenzelle mit positivem Signal (a), das Wirtszellzytoplasma ist jedoch negativ (b). Paraffin, Anti-Histiozyten-Antigen (Klon MAC387), Hämalaun.

Die Wirtszelle konnte mit dem anti-Vimentin-Antikörper angefärbt werden, jedoch wurde kein positives Signal bei Verwendung des Makrophagen-Markers detektiert (siehe **Abbildung IV-48**).

5 Färbe-Reaktionen

Die Färbereaktion von Wirtszelle und Parasiten wird im Folgenden zusammengefasst.

5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zytoplasma und Kerne der Tachyzoiten stellten sich schwach basophil dar, wobei der Kern ein wenig basophiler war (siehe **Abbildung IV-40**, S. 127).

Das Zytoplasma der Bradyzoiten war eosinophil mit einem deutlich basophileren Kern. Das Wirtszellzytoplasma war eosinophil mit schwach basophilen Kernen, die einen deutlichen dunkleren Nukleolus besaßen (siehe **Abbildung IV-49**). Die innerste Schicht der Zystenwand war grünlich und konnte vor allem bei den großen, reifen Zysten nur noch als dünnes Band wahrgenommen werden. Die äußere, dicke, hyaline Schicht der Zystenwand war elfenbeinfarben.

Die innerhalb der parasitophoren Vakuole befindlichen Korpuskeln stellten sich grün-gräulich dar.

In der Hämalaun-Kernfärbung stellte sich die grünliche Schicht violett dar, das Wirtszellzytoplasma war schwach violett mit etwas dunkleren Kernen.

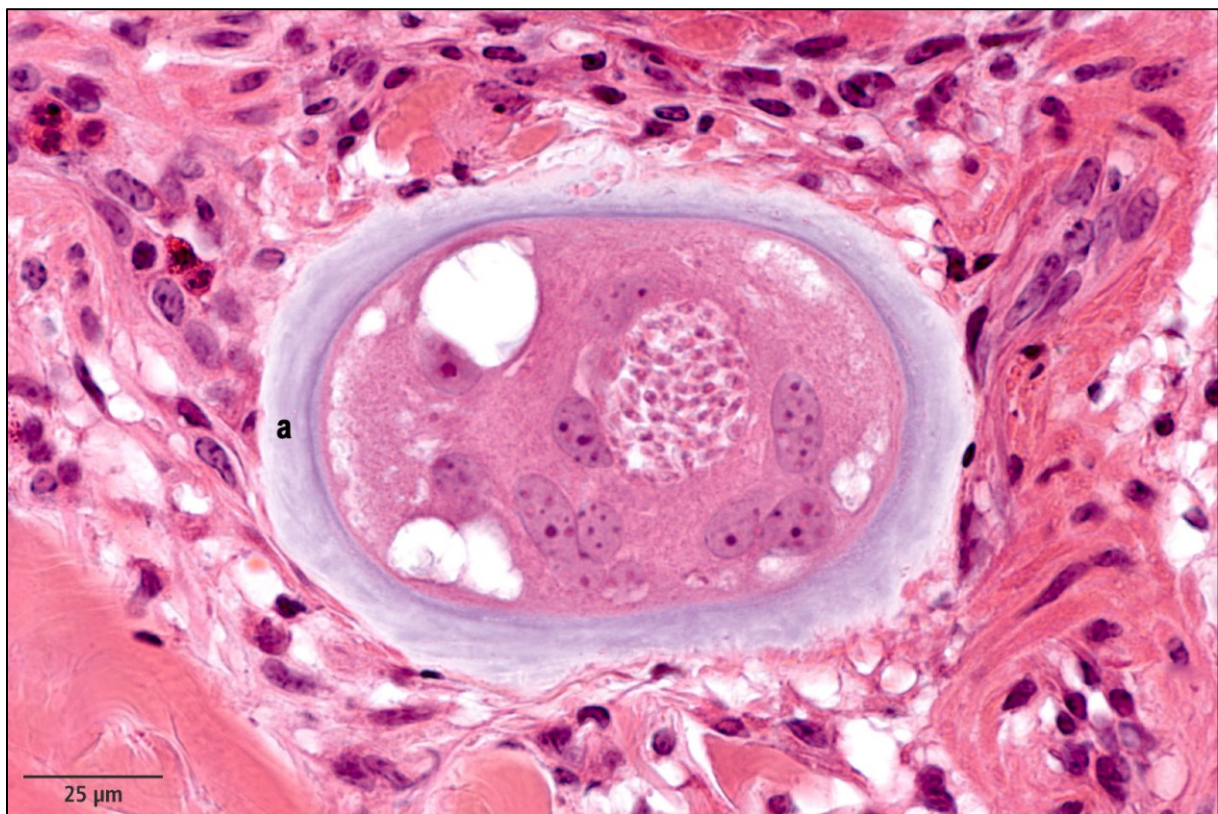


Abbildung IV-49: VT20, Chronisches Stadium (Tag 26): Unreife Zyste mit umgebender grünlicher Schicht (a). GMA/MMA, HE.

5.2 Färbung nach Giemsa

Das Zytoplasma der Tachyzoiten zeigte sich dunkel-violett mit undeutlich erkennbarem bläulichen Zellkern.

Das Zytoplasma der Bradyzoiten war hell und schwach basophil mit einem dunkleren Zellkern. Das Wirtszellzytoplasma war schwach basophil mit bläulichen Zellkernen und deutlichem, basophilen Nukleolus. Die innerste Zystenwand zeigte sich kräftig violett (siehe **Abbildung IV-50**), die äußere Zystenwand war schwach violett, glasig und nahezu durchscheinend.

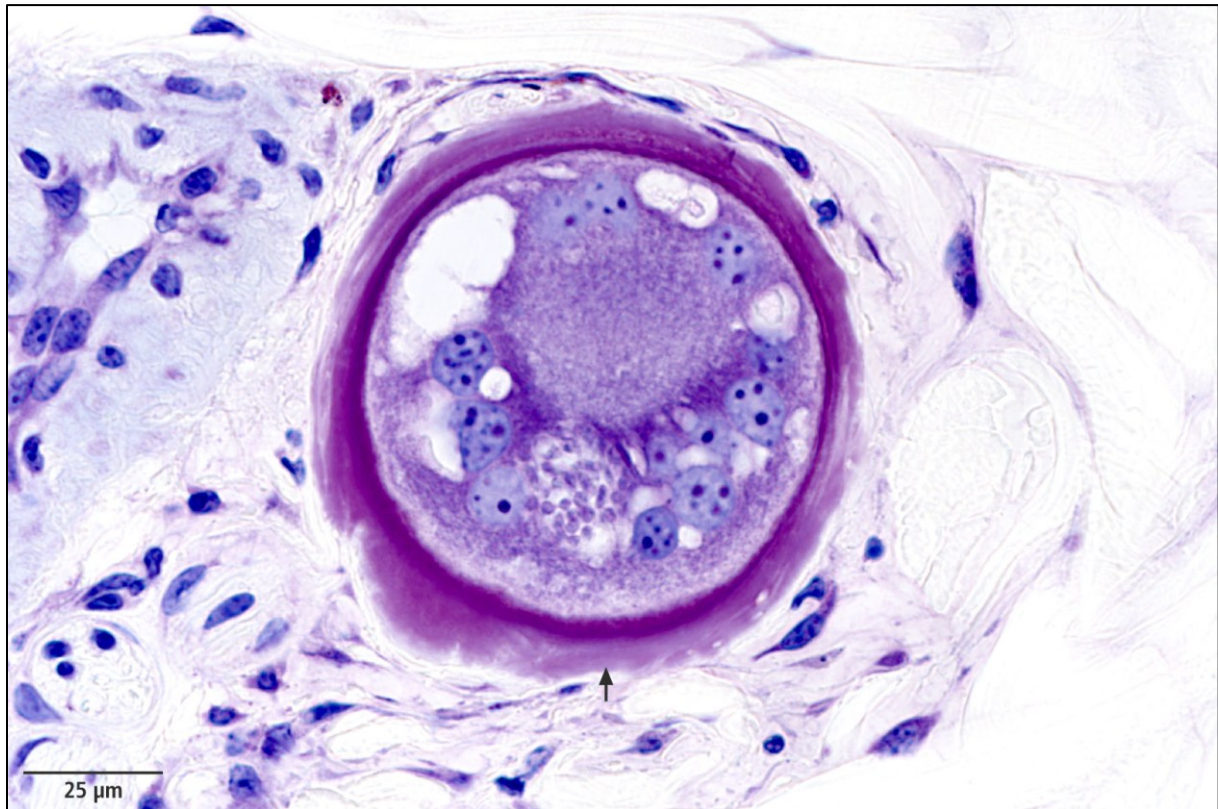


Abbildung IV-50: VT20, Chronisches Stadium (Tag 26): Unreife Zyste mit umgebender violetter Schicht (Pfeil) in der Färbung nach Giemsa. GMA/MMA, Giemsa.

5.3 PAS-Reaktion

Das Zytoplasma der Tachyzoiten zeigte sich dunkel-violett mit deutlichen, PAS-positiven, intrazytoplasmatischen Granula (siehe **Abbildung IV-41**, S. 128).

Das Zytoplasma der Bradyzoiten war hell- bis dunkel-violett mit deutlichen PAS-positiven Granula. Das Wirtszellzytoplasma war hell-rötlich und abschnittsweise ungleichmäßig, jedoch deutlich PAS-positiv, die Wirtszellkerne wirkten grau-bläulich. Die Zystenwand war von hell-rötlicher Farbe (siehe **Abbildung IV-51**, S. 139).

Die Korpuskeln, die sich innerhalb der parasitophoren Vakuole befanden waren deutlich PAS-positiv.

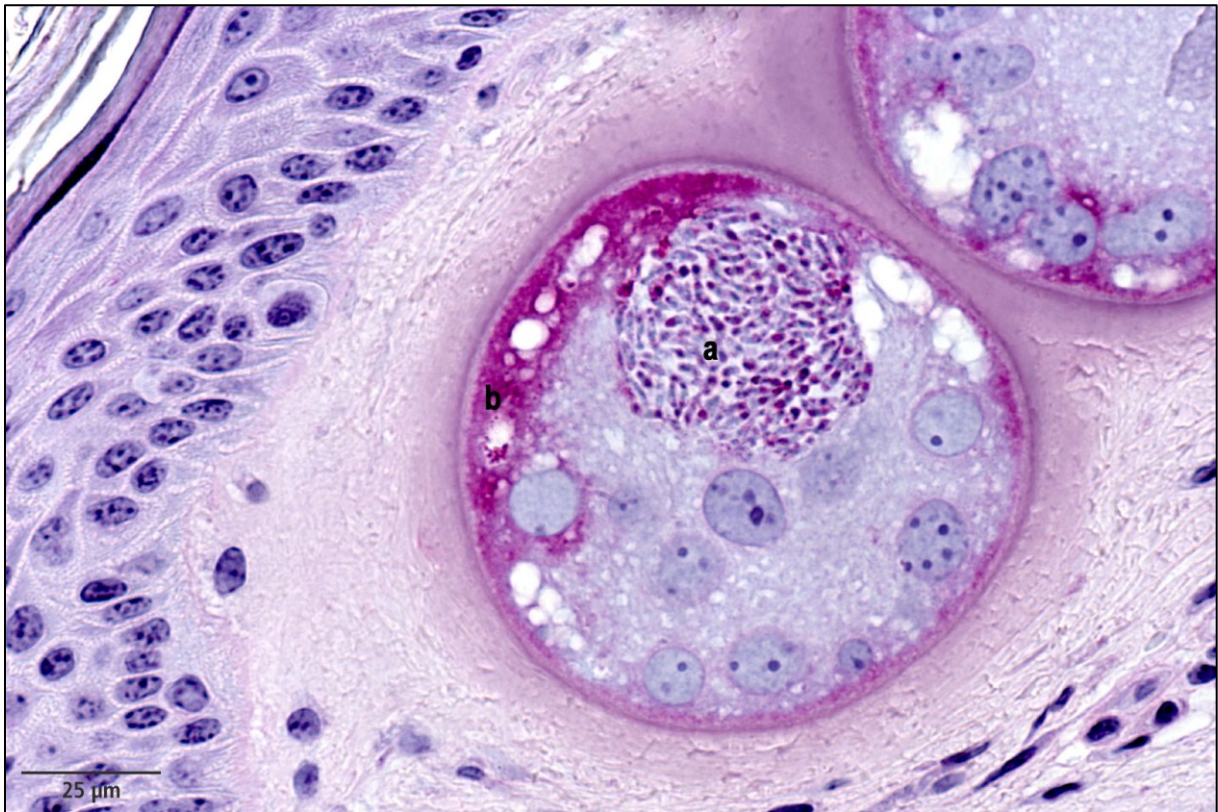


Abbildung IV-51: VT6, Chronisches Stadium (Tag 25): Unreife Zyste in der PAS-Reaktion. Bradyzoiten beinhalten PAS-positive, granuläre Elemente (a). Teile des Wirtszellzytoplasmas sind PAS-positiv (b). GMA/MMA, PAS.

5.4 Masson-Goldner-Färbung

Das Zytoplasma der Bradyzoiten stellte sich schwach rötlich mit einem etwas dunkleren, rötlichen Kern dar. Das Wirtszellzytoplasma war grau-rötlich mit etwas dunkleren, grau-rötlichen Kernen und rötlichen Nukleoli. Die Zystenwand war von blauer Farbe.

5.5 Toluidinblau-Safranin-Färbung

Das Zytoplasma der Tachyzoiten war bläulich und dunkel mit dunklerem Zellkern.

Das Zytoplasma der Bradyzoiten war hellblau mit dunkelblauem Kern. Das Wirtszellzytoplasma war hellblau mit hellblauen Kernen und dunkleren Nukleoli. Das unter dem Transmissionselektronenmikroskop elektronendichte Material im Wirtszellzytoplasma

war orange-rötlich. Die innere Zystenwand war porzellanfarben, die äußere Zystenwand zeigte eine orange Färbung.

Die in der parasitophoren Vakuole befindlichen Korpuskeln waren von orange-rötlicher Färbung (siehe **Abbildung IV-52**).

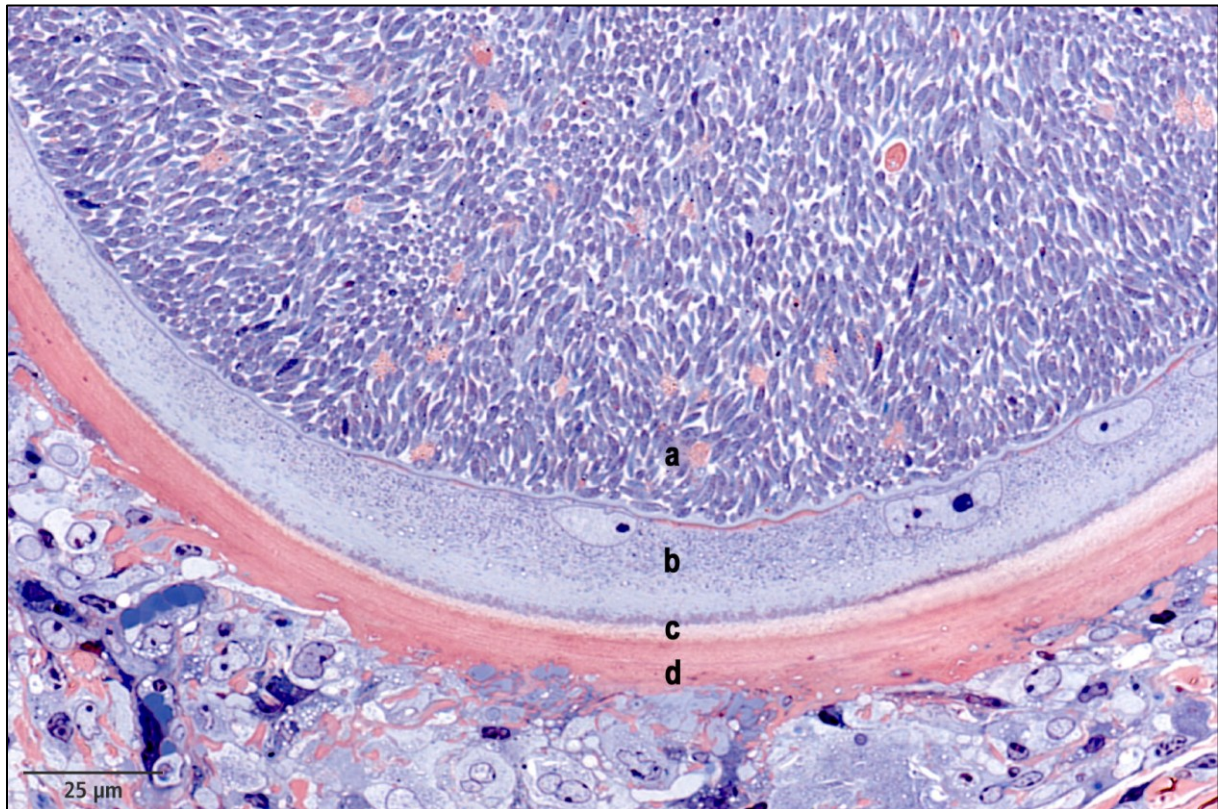


Abbildung IV-52: VT22, Chronisches Stadium (Tag 189): Reife Zyste mit parasitophorer Vakuole und darin enthaltenen Bradyzoiten und rötlichen Korpuskeln (a), Wirtszellzytoplasma (b), Grundsubstanzschicht (c, entspricht der grünlichen Schicht in der HE-Färbung) und hyaliner Schicht (d). Semidünnschnitt, Toluidinblau/Safranin.

V. DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, die klinischen und pathomorphologischen Veränderungen im akuten und chronischen Stadium der bovinen Besnoitiose nach natürlicher Infektion mit *Besnoitia besnoiti* zu beschreiben. Tachyzoiten, Bradyzoiten und Gewebezysten von *B. besnoiti* sollten histologisch und ultrastrukturell dargestellt werden. Insbesondere die Darstellung der Tachyzoiten, die in der Routinefärbung nur sehr schwer nachzuweisen waren, erforderte die Etablierung einer Methode, um diese eindeutig zu erkennen. Hierfür wurde ein immunhistochemisches Verfahren an Formalin-fixiertem in Paraffin eingebettetem Material etabliert, das Endozoiten von *B. besnoiti* darstellte. Tachyzoiten in GKO-Mäusen fungierten sowohl bei der Etablierung der Immunhistochemie als auch beim Vergleich der Ultrastruktur als Positivkontrolle.

Die immunhistochemische Darstellung von *B. besnoiti*-Tachyzoiten und die Entwicklung der *B. besnoiti*-Gewebezysten nach natürlicher Infektion konnte somit erstmalig beschrieben werden. Des Weiteren konnten erstmalig Tachyzoiten in der Rinderhaut und in Organen experimentell infizierter GKO-Mäuse ultrastrukturell beschrieben werden.

1 Histologischer Nachweis der Parasiten

1.1 Immunhistochemischer Nachweis

1.1.1 Immunhistochemie an Paraffin-Schnitten

Mit Hilfe der Immunhistochemie sollte Antigen von *B. besnoiti*-Stadien im Gewebe nachgewiesen werden. Das immunhistochemische Protokoll erfolgte nach einem Standardprotokoll für die Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Der hierbei verwendete Primärantikörper – ein Kaninchenantiserum eines experimentell mit *B. besnoiti* infizierten Kaninchens – wurde freundlicherweise von Dr. Walter Basso (Institut für Parasitologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich) zur Verfügung gestellt. Das Antiserum reagierte mit Epitopen aus dem Inneren des Parasiten und seiner Membran sowie aus der parasitophoren Vakuole. Die Verdünnung von 1:2000 wurde ausgewählt, um *B. besnoiti*-Tachyzoiten und

Bradyzoiten spezifisch zu detektieren. Sowohl Tachyzoiten in Geweben von Mäusen und Rindern als auch Bradyzoiten konnten leicht anhand des intensiven Signals identifiziert werden. In höheren Verdünnungen konnte bei denselben Schnitten eine Ausdünnung des Signals festgestellt werden.

Die immunhistochemische Darstellung von *B. besnoiti*-Stadien in Geweben von Rindern und Mäusen ist in der Literatur nicht beschrieben. Jedoch wurden Tachyzoiten und Bradyzoiten der Spezies *B. bennetti*, *B. neotomofelis* und *B. oryctofelisi* unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchenantiserums in Geweben von Eseln, Buschratten, Gerbils und GKO-Mäusen immunhistochemisch nachgewiesen (Dubey und Lindsay 2003; Dubey *et al.* 2005; Dubey und Yabsley 2010).

Die Spezifität der Anti-*B. besnoiti*-Immunhistochemie in Abgrenzung zu den Spezies *T. gondii*, *N. caninum* und einer nicht näher spezifizierten *Sarcocystis*-Art wurde anhand von Gewebezysten (alle) und Tachyzoiten (nur *T. gondii* und *N. caninum*) in den standardmäßig verwendeten Verdünnungen von 1:1000 und 1:2000 überprüft. In einer Verdünnung von 1:1000 traten bei Bradyzoiten von *N. caninum* und in einer Verdünnung von 1:2000 bei Bradyzoiten von *Sarcocystis* spp. schwache intraparasitäre Signale auf. Diese äußerst schwachen intrazystischen Signale waren jedoch von einer wesentlich geringeren Intensität und konnten leicht von den starken Signalen der *B. besnoiti*-Stadien unterschieden werden.

Die Spezifität zwischen verschiedenen *Besnoitia*-Spezies wurde nicht überprüft, jedoch erscheint eine Kreuzreaktion möglich, da immunhistochemische Kreuzreaktionen bei der Verwendung von polyklonalen Kaninchenantisera zwischen *B. oryctofelisi* und *B. neotomofelis* beschrieben sind (Dubey und Yabsley 2010).

Im Gewebeschnitt vorhandenes bräunliches Pigment konnte von den auch bräunlichen Signalen der Parasitenstadien deutlich abgegrenzt werden. Da das Pigment einen anderen Farbton und einen granulären Charakter besaß, konnte es gut von den rundlichen bis bananenförmigen Parasiten-Signalen unterschieden werden.

Mit zunehmendem Ausreifungsgrad der Gewebezysten konnte eine diffuse Braunfärbung des Wirtszellzytoplasmas beobachtet werden. Darüber hinaus wurde zusätzlich in der Zysten Umgebung eine diffuse Braunfärbung der umliegenden Strukturen insbesondere der Zellkerne festgestellt. Eine Diffusion von Bradyzoiten-Antigen in das Wirtszellzytoplasma und die Umgebung und eine Detektion desselben erscheint möglich. Da dieser Effekt nur bei

nahezu ausgereiften Zysten auftrat, liegt ein Zusammenhang mit der Zunahme an Bradyzoiten(-Antigen) in der Umgebung nahe. Eine weitere Erklärung für die Entstehung des Effekts könnte die fokal begrenzte massenhafte Umsetzung an Chromogen (DAB) sein und dessen Diffusion in die Umgebung.

Die verwendete Immunhistochemie erforderte keine Vorbehandlung der Schnitte und stellt eine einfach und schnell durchzuführende Methode dar, *B. besnoiti*-Tachyzoiten und Bradyzoiten von *B. besnoiti* in Geweben von Rindern und Mäusen darzustellen.

1.1.2 Immunhistochemie an GMA/MMA- und Semidünnschnitten

Kunststoffschnitte sind unter morphologischen Gesichtspunkten den Schnitten aus der Paraffin-Einbettung überlegen. Einerseits liegt das daran, dass die Gewebeschrumpfung bei der Kunststoffeinkbettung wesentlich geringer ist. Andererseits lassen sich Kunststoffschnitte viel dünner schneiden, was bei der lichtmikroskopischen Untersuchung ein deutlicheres Bild ergibt. Zusätzlich zu erwähnen ist, dass in Paraffin eingebettete Rinderhaut sehr viel schwerer zu schneiden ist als die Haut von Mäusen oder parenchymatöse Organe. Aus diesem Umstand ergeben sich dickere Schnitte im Paraffin und damit eine weniger deutliche Morphologie. Eine Kombination aus deutlicherer Morphologie (Kunststoff) und eindeutiger Identifizierung von Parasiten (Paraffin-Immunhistochemie) wäre wünschenswert gewesen und stellte den wesentlichen Vorteil einer Kunststoff-Immunhistochemie dar.

Problematisch bei der Immunhistochemie an Kunststoffschnitten ist, dass im Gegensatz zu Paraffinschnitten das Einbettungsmedium nicht herausgelöst werden kann. Eine Antigen-Demaskierung kann durch aggressive Behandlung mit Natriumäthylat (Böck 1984) und längere Protease-Inkubation erfolgen.

Aufgrund des hohen Antikörperverbrauchs und keinerlei detektierbaren Signalen trotz unterschiedlicher Protokolle wurde die Anwendung der im Paraffinschnitt gut funktionierenden anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie bei den Semidünnschnitten nicht weiterverfolgt. Um Parasiten aufzufinden, wurden die Semidünnschnitte sorgfältig in 1000facher Vergrößerung mittels Öl-Immersion durchgemustert und ausgewählte Ultradünnschnitte unter dem Elektronenmikroskop erneut durchgemustert.

Die in der GMA/MMA-Immunhistochemie nachgewiesenen, feinen membranständigen Signale waren von unspezifischen Signalen nur schwierig abzugrenzen. Bei Tachyzoiten

gelang eine eindeutige Identifizierung nur bei staudenförmigen intraendothelial liegenden Parasiten, da diese deutlich ins Gefäßlumen hineinragten. Einzelne intrazelluläre oder intravaskuläre Tachyzoiten konnten nicht eindeutig angesprochen werden. Auch hier wurden aufgrund des hohen Verbrauchs und zu schwachen Signalen von einer weiteren Verwendung abgesehen.

1.2 Färbetechnischer Nachweis

Der initiale Gedanke war, die PAS-Reaktion als einfache und verlässliche Methode zur Identifizierung der Tachyzoiten sowohl in den Geweben der Rinder als auch in den Geweben der Mäuse zu verwenden. Jedoch stellte sich heraus, dass die PAS-Positivität von Tachyzoiten nicht den gesamten Zellkörper des Parasiten betrifft, sondern nur einzelne granuläre Elemente im Zytoplasma, vermutlich die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Amylopektin-Granula. PAS-positiv reagieren jedoch auch Basalmembranen und intrazelluläre Energiespeicherprodukte verschiedener Zellen, wie beispielsweise Glykogen (Mulisch und Welsch 2010). Insbesondere in Organen wie Leber, Niere und Haut war es unmöglich, die feinen, granulären, intraparasitären Signale von anderen Signalen zu unterscheiden. Die PAS-Reaktion eignet sich daher nach Meinung des Autors nicht als Möglichkeit der histologischen Diagnostik von Tachyzoiten.

Die in der Literatur beschriebene PAS-Positivität von Bradyzoiten (Basson *et al.* 1970) konnte in diesen Untersuchungen nicht vorbehaltlos bestätigt werden, da auch hier nur Teile der Bradyzoiten mit einem feinen granulierten intrazytoplasmatischen Muster PAS-positiv reagierten. Bradyzoiten sind demnach nicht PAS-positiv, sondern sie beinhalten PAS-positive Elemente.

2 Lokalisation der Gewebezysten

B. besnoiti-Gewebezysten wurden prinzipiell immer in Geweben gefunden, die vaskularisiert waren. In nicht vaskularisierten Geweben, wie beispielsweise dem epithelialen Überzug des *Integumentum commune*, Korneastroma, Knorpel oder Epithelien des Respirationstraktes und des Harn- und Geschlechtsapparates konnten keine Zysten nachgewiesen werden. In der Haut befanden sich weitaus mehr Zysten im gefäßreichen *Stratum papillare* als im

kollagenfaserreichen, gefäßarmen *Stratum reticulare*. Diese Beobachtungen stimmen mit den Angaben von McCully und Mitarbeiter überein, die zu dem Schluss kommen, dass das perivaskuläre Auftreten von Gewebezysten in der Körperperipherie auf eine Affinität zu Blutgefäßen hindeuten könnte (McCully *et al.* 1966). Die Schilderungen anderer Autoren, die beispielsweise von Gewebezysten in der Kornea berichten (Gentile *et al.* 2012) konnten – trotz des ausgesprochen dichten Befalls in anderen Geweben wie skleraler Konjunktiva oder Unterhaut und Faszien – bei den zwei Limousinrindern VT20 und VT22 nicht bestätigt werden.

In viszeralen Organen konnten sowohl makroskopisch als auch histologisch nur einzelne Zysten gefunden werden. Histologisch wurde jeweils nur eine Zyste in einem Lungenanschnitt und in der Kapsel eines abdominalen Hämallymphknotens gefunden. McCully und Mitarbeiter berichten von ähnlichen Befunden, da sie in den viszeralen Gefäßen und im Bindegewebe der Körperhöhlen nur wenige oder gar keine Zysten entdecken konnten (McCully *et al.* 1966).

Der Befall mit Gewebezysten war insbesondere in Haut und Gefäßen an den distalen Gliedmaßen sehr viel stärker als in den körpernen Regionen. Vermutlich besteht hier ein Zusammenhang mit den Ödemen, die im akuten Stadium gefunden werden können. Möglicherweise finden sich in diesen Flüssigkeitsansammlungen aus den Gefäßen stammende Tachyzoiten, die sich letztendlich in Bradyzoiten differenzieren und Zysten an den ehemaligen Lokalisationen der Ödeme verursachen. Ödeme lassen sich hauptsächlich an den distalen Gliedmaßen und Unterkörper finden (Jacquiet *et al.* 2010). Klinisch konnte allerdings nur bei einem Tier ein Unterhautödem an den distalen Gliedmaßen nachgewiesen werden.

3 Typisierung der Säugetierwirtszelle

Die Befunde der elektronenmikroskopischen Untersuchung und der Masson-Goldner-Färbung, die Kollagen(-Fibrillen) als Hauptbestandteil der hyalinen Schicht identifizieren, wurden auch schon von anderen Autoren beschrieben (Majzoub *et al.* 2010). Unter der Annahme, dass die hyaline Schicht von der Wirtszelle gebildet wird (Basson *et al.* 1970), scheint es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der Wirtszelle um Fibroblasten handelt, da

diese eine der Hauptproduzenten von Kollagen darstellen. Die Befunde der immunhistochemischen Untersuchungen an der Wirtszelle (anti-Vimentin: positiv, anti-Histiozyten-Antigen: negativ) unterstützen die Theorie von Fibroblasten im Gegensatz zu Makrophagen als Wirtszelle. Dies deckt sich auch mit den Befunden und Schlussfolgerungen anderer Autoren (Majzoub *et al.* 2010). Die Annahme anderer Autoren, die hyaline Schicht würde von umgebenden Fibroblasten gebildet (Pols 1960), erscheint weniger wahrscheinlich, da perizystische spindelförmige Zellen nicht bei allen Zysten nachzuweisen waren. Zudem waren die spindelförmigen Zellen erst im späteren Verlauf zu finden, als die hyaline Schicht schon deutlich ausgeprägt war.

4 Übertragungsversuch

Obgleich die Tierzahlen relativ gering waren, konnte bei drei Fleckvieh-Tieren eine natürliche Infektion mit *B. besnoiti* beobachtet werden. Bei zwei Tieren konnte die Infektion klinisch, serologisch, histologisch und mittels Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut bestätigt werden. Bei einem Tier wurde die Infektion zwar nicht klinisch und histologisch beobachtet; jedoch konnte auch hier die Infektion serologisch und mittels Nachweis von Parasiten-DNA in der Haut bestätigt werden.

Die bei VT6 zwei Tage vor Beginn der eigentlichen Fieberphase auftauchende Temperaturerhöhung beschreibt Bigalke als „prodromale“ Temperaturerhöhung ein bis zwei Tage vor der eigentlichen Fieberphase (Bigalke 1968). Aus diesem Grund wurde als Tag 1 bei der histologischen Untersuchung der erste Tag der mehrtägigen eigentlichen Fieberphase gewählt.

Am Tag der Vorstellung wurde VT20 in einem Korral von der Ursprungsherde separiert. Jedoch gestaltete es sich schwierig, das Tier danach auf den Transportwagen zu treiben. Der Stress des Treibens und des Transportes sowie die erhöhten Außentemperaturen an diesem Tag (Maximaltemperatur am 20.08.2009: 30,7 °C, Quelle: Deutscher Wetterdienst) bedingten sehr wahrscheinlich die Erhöhung von Körpertemperatur sowie Herz- und Atemfrequenzen, die auf diesen Tag beschränkt blieben. Diese Annahme wird gefestigt durch die Normalisierung dieser Parameter an den darauffolgenden Tagen.

4.1 Möglichkeiten der Ansteckung

Die bovine Besnoitiose kann vom Zwischenwirt Rind auf andere Rinder sowohl über direkten Kontakt, über Insekten als auch iatrogen über Kanülen übertragen werden (Pols 1960; Bigalke 1968).

Eine iatrogene Übertragung auf die Tiere in unserem Experiment ist auszuschließen, da für jede Manipulation am Tier, bei dem eine Verletzung der Haut verursacht wurde sterile Gerätschaften verwendet wurden (Hautstanzen, Kanülen,..).

Es wird angenommen, dass die Übertragung durch direkten Kontakt überwiegend zwischen Tieren mit Wunden stattfindet, da *B. besnoiti*-Zysten sich überwiegend oberflächlich in der Haut befinden (EFSA-Statement 2010; Fernández-García *et al.* 2010). Ein enger direkter Kontakt zwischen den Tieren war beispielsweise während der Brunst durchaus vorhanden. Durch die regelmäßige Haut- und Blutprobenentnahme entstanden Verletzungen der Haut, die möglicherweise zu günstigeren Bedingungen für diesen Übertragungsweg führten. Die Hautwunden wurden zwar direkt nach der Probenentnahme mit Sprühverbänden oder Hautklammern versorgt, die Wundränder waren zum Teil jedoch immer noch sichtbar und auch für andere Tiere zugänglich.

Über kurze Distanzen lässt sich die bovine Besnoitiose auch über Insekten übertragen (Bigalke 1968). Da alle zu untersuchenden Tiere für wenige Stunden in einem Fressgitter nebeneinander fixiert wurden, kommt dieser Übertragungsweg aufgrund der geringen Entfernung zwischen den einzelnen Tieren genauso in Betracht. Ein Befall mit hämatophagen Insekten sowie ein Wirtswechsel der Insekten vom einen auf das andere Tier wurden beobachtet. Interessanterweise befanden sich auf den Tieren VT4 und VT6 während der Fieberphase deutlich mehr Insekten als auf den danebenstehenden Tieren. Möglicherweise war dieser Effekt durch die Erhöhung der Körpertemperatur bedingt. Eine während der Fieberphase gesteigerte Abgabe von Stoffen, die für blutsaugende Insekten als Attraktanz wirken, wie beispielsweise CO₂, könnte hierfür hypothetisch in Frage kommen. Für diverse hämatophage Insekten, unter anderem auch *Stomoxys calcitrans*, eine in Deutschland vorkommende hämatophage Fliege, ist CO₂ als Attraktanz beschrieben (Cilek 1999).

Andere berichteten, dass Bullen häufiger mit *B. besnoiti* infiziert sind und dass die bovine Besnoitiose bei männlichen Tieren schwerer verläuft (Schulz 1960; Legrand 2002). Eine mechanische Übertragung während des Deckaktes wird diskutiert (Gollnick *et al.* 2010c).

Vermutlich würde diese durch Ruptur von direkt unter der Schleimhaut gelegenen Zysten während des intensiven Schleimhaut-Schleimhaut-Kontaktes im Verlaufe des Deckaktes erfolgen. Trotz des beobachteten intensiven Kontaktes des Bullen und der infizierten Rinder, trotz beobachteter Deckakte und trotz der im *Vestibulum vaginae* der infizierten Rinder zahlreich vorhandenen Zysten blieb die erwartete Infektion des Bullen aus. Unter Berücksichtigung oben genannter Punkte ist es verwunderlich, dass sich drei Kalbinnen infizierten, der Bulle jedoch nicht. Möglicherweise spielte die venerische Übertragung im Gegensatz zu oben genannten anderen Übertragungswegen in unserem Versuch keine wesentliche Rolle.

Mögliche Gründe, warum die bovine Besnoitiose eine scheinbare Prädisposition für Bullen besitzt sind spekulativ. Möglicherweise sind rangniedere Bullen in größeren Herden vermehrtem Stress ausgesetzt und zeigen eine durch Immunsuppression bedingte höhere Empfänglichkeit.

Theoretisch könnte die Infektion der Rinder auch über den Kontakt mit Oozysten, die vom Endwirt ausgeschieden wurden, erfolgt sein. Da der Endwirt der bovinen Besnoitiose unbekannt ist, bleibt dieser Übertragungsweg jedoch spekulativ.

4.2 Schätzung der Infektionszeitpunkte

Bigalke gibt im Mittel 13 Tage als Inkubationszeit nach „natürlicher“ Infektion an. Die Zeitspanne bis zum Auftauchen der ersten Zysten in der skleralen Konjunktiva gibt er bei „natürlicher“ Infektion mit im Mittel 40,5 Tagen nach dem ersten Tag der Fieberphase an oder im Mittel 53,6 Tage *post infectionem* (Bigalke 1968). Auf Basis dieser Daten lassen sich die Infektionszeitpunkte der Tiere unseres Versuchs schätzen:

4.2.1 Schätzung der Infektionszeitpunkte von Versuchstier 4 und Versuchstier 6

Vom Beginn der Fieberphase ausgehend, liegt der geschätzte Zeitpunkt der Infektion bei VT4 um den 10. September 2009. Die ersten Zysten in der skleralen Konjunktiva tauchten 27 Tage nach Beginn der Fieberphase auf. Vom Auftreten der ersten Zysten in der skleralen Konjunktiva ausgehend, liegt der geschätzte Infektionszeitpunkt um den 28. August 2009.

Vom Beginn der Fieberphase aus gesehen liegt der geschätzte Zeitpunkt der Infektion bei VT6 um den 5. September 2009. Die ersten Zysten in der skleralen Konjunktiva tauchten 35

Tage nach Beginn der Fieberphase auf. Vom Auftreten der ersten Zysten in der skleralen Konjunktiva ausgehend, liegt der geschätzte Infektionszeitpunkt also um den 31. August 2009.

Bigalke untersuchte die skleralen Konjunktiven in wöchentlichen Abständen und gibt an, dass bei sechs Tieren eine Woche vor dem eigentlichen Auftauchen der Zysten sehr geringe Erhebungen zu sehen gewesen wären. Da diese aber wahrscheinlich übersehen worden wären, hätte man nicht erwartet, sie zu sehen, gab er den Zeitpunkt des Auftretens erster Zysten in der skleralen Konjunktiva eine Woche später an (Bigalke 1968).

Ginge man ähnlich wie Bigalke vor und legte das Auftauchen der ersten sklerokonjunktivalen Zysten sieben Tage in die Vergangenheit, läge der „korrigierte“ geschätzte Infektionszeitpunkt bei VT4 um den 04. September und bei VT6 um den 07. September, also etwas näher an der Schätzung, die auf dem Beginn der Fieberphase basiert.

Nimmt man an, dass sich die Zysten histologisch annähernd gleich schnell entwickeln, ist es möglich, den Infektionszeitpunkt ab dem Zeitpunkt des histologischen Auftauchens der ersten Zyste zu schätzen.

Basson und Mitarbeiter konnten elf Tage nach intravenöser experimenteller Infektion von Rindern die ersten kleinen Zysten nachweisen (Basson *et al.* 1970). Die durchschnittliche Inkubationszeit lag bei 2,7 Tagen, würde man von einer „natürlichen“ Inkubationszeit von 13 Tagen ausgehen, so die Autoren, müsste man zur Schätzung des Infektionszeitpunktes zehn Tage zu ihren Daten hinzuaddieren. Damit ergibt sich eine Zeitdauer von ca. 21 Tagen vom Infektionszeitpunkt bis zum ersten histologischen Nachweis einer Zyste.

Bei VT4 und VT6 traten zehn beziehungsweise neun Tage nach Beginn der Fieberphase die ersten histologisch nachweisbaren kleinen Zysten auf. Der geschätzte Infektionszeitpunkt läge bei VT4 um den 11. September 2009 und bei VT6 um den 05. September 2009.

Möglicherweise ist die Schätzung anhand des Beginns der Fieberphase oder anhand des Auftretens der ersten histologisch nachweisbaren Zyste genauer als die Schätzung anhand der Zysten in der skleralen Konjunktiva. Bei schweren Fällen der bovinen Besnoitiose beispielsweise ist die Schätzung anhand der sklerokonjunktivalen Zysten nicht sehr zuverlässig (Bigalke 1968). Da das Erkennen der Zysten nicht unwesentlich von optimalen Lichtverhältnissen, Kooperation des Patienten, guter Fixierung des Kopfes und der Erfahrung

des Untersuchers abhängt, scheint die Schätzung anhand histologisch auftretender Zysten oder anhand des Beginns der Fieberphase objektiver und zuverlässiger.

4.2.2 Schätzung des Infektionszeitpunktes von Versuchstier 8

Die einzigen Schätzungen zum Infektionszeitpunkt, die bei VT8 möglich sind, gehen vom Zeitpunkt der Serokonversion aus. VT4 und VT6 serokonvertierten sieben beziehungsweise drei Tage nach Beginn der Fieberphase. Schätzt man bei VT8 mit einem Mittel von fünf Tagen, liegt der geschätzte Infektionszeitpunkt um den 11. Oktober 2009.

4.2.3 Schätzung des Infektionszeitpunktes von Versuchstier 20

Die ersten Zysten in der skleralen Konjunktiva traten bei VT20 am 12. September 2009 auf, der geschätzte Infektionszeitpunkt liegt demnach um den 21. Juli 2009 und der geschätzte Beginn der Fieberphase um den 03. August 2009. VT20 wurde am 19. August vom Besitzer als erkrankt auf der Weide identifiziert, ein seit 16 Tagen erkranktes Tier wäre dem Besitzer sehr viel früher aufgefallen, da der Tierbesitzer eine ausgesprochen gute Herden- und Einzeltierbeobachtung durchführte. Diese Schätzung scheint daher sehr unrealistisch.

Schätzt man anhand des Auftretens der ersten histologisch nachweisbaren Zyste, ergibt sich ein Infektionszeitpunkt um den 03. August 2009. Der Beginn der Fieberphase läge dann um den 16. August 2009, unter Berücksichtigung der aufmerksamen Tierbeobachtung durch den Besitzer scheint auch hier die Schätzung anhand des histologischen Auftretens der ersten Zyste genauer.

Eine Schätzung anhand der Serokonversion ist bei diesem Tier nicht möglich, da es auf der Weide nicht regelmäßig serologisch untersucht wurde.

4.2.4 Schätzung des Infektionszeitpunktes von Versuchstier 22

Die Genauigkeit der Schätzung bei diesem Tier ist fraglich, da dieses Tier nicht in regelmäßigen Abständen untersucht werden konnte. Aus diesem Grund wurde auch der Infektionszeitpunkt nicht anhand der ersten histologisch nachweisbaren Zysten geschätzt, da diese sich beim ersten histologischen Nachweis bereits in einem fortgeschrittenen Reifestadium befanden. Erste Zysten in der skleralen Konjunktiva wurden bei diesem Tier am 19. Oktober 2009 gesehen. Der geschätzte Zeitpunkt der Infektion liegt demnach um den 27. August 2009.

4.3 Histologie

Obwohl nur bei einem Tier klinisch Unterhautödeme aufgefallen waren, zeigten alle Tiere histologisch ein diffuses dermales Ödem, das bis zu 14 Tage lang nachweisbar war. Die Reaktion auf die extrazystisch proliferierenden Parasiten bestand aus einer Zunahme der geringgradig vorhandenen perivaskulären Zellinfiltrationen und einer zusätzlichen Infiltration mit Makrophagen. Eindeutige Hinweise auf eine Vaskulitis, wie sie von anderen Autoren beschrieben werden (Basson *et al.* 1970), fanden sich nicht.

Die von Basson und Mitarbeiter beobachtete Entwicklung der *B. besnoiti*-Gewebezysten nach experimenteller Infektion von Rindern konnte auch in den hier aufgeführten histologischen Untersuchungen nach natürlicher Infektion bestätigt werden (Basson *et al.* 1970).

Der mehrtägigen extrazystischen Proliferationsphase (neun und 14 Tage) schließt sich die Phase der intrazystischen Proliferation an. Wie oben beschrieben, ist dieser Übergang fließend, und es können für wenige Tage sowohl junge Zysten als auch intraendothelial befindliche Parasiten nachgewiesen werden. Die zur Gewebezyste werdende, vom Parasiten befallene Wirtszelle hypertrophiert und beinhaltet hypertrophierte, durch Endomitosen entstandene Kerne. Außerhalb der Wirtszelle lagert sich eine grünliche Schicht an, die die Wirtszelle zirkulär umgibt. Das Färbeverhalten in der Färbung nach Giemsa und die Befunde der elektronenmikroskopischen Untersuchungen legen nahe, dass es sich hierbei um eine aus Grundsubstanz bestehende Schicht handelt.

Die durch Endodyogenie proliferierenden Parasiten dehnen die parasitophore Vakuole aus und nehmen immer mehr Platz im Wirtszellzytoplasma ein. Interessanterweise war das Wachstum der Wirtszelle dem Wachstum der parasitophoren Vakuole voraus, so dass sich letztere in das Zytoplasma der synzytiumartigen Riesenzelle ausdehnte. Außerhalb der inneren, grünlichen Schicht formiert sich eine weitere, elfenbeinfarbene, äußere, hyaline, elektronenmikroskopisch aus Kollagenfibrillen bestehende Schicht. Diese komprimiert die anfänglich prominente innere Schicht mit zunehmender Ausreifung der Zyste, so dass letztere bei reifen Zysten nur noch als dünnes Band oder gar nicht mehr zu erkennen ist. Dies könnte auch der Grund sein, warum diese Grundsubstanz-Schicht in Beschreibungen anderer Autoren, die reife Zysten untersuchten, keine Erwähnung fand.

Bei VT4 konnte bereits 23 Tage nach Beginn der Fieberphase eine entzündliche, perizystische Reaktion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei VT6 und VT20 erst 39 und 40 Tage nach Beginn der Fieberphase respektive Vorstellung die ersten entzündlichen Reaktionen nachgewiesen werden.

Die Wirtsreaktion setzte bereits bei unreifen Zysten ein. Zysten wurden als reif bezeichnet, sobald die parasitophore Vakuole so groß war, dass das Wirtszellzytoplasma nur als dünnes Band zu erkennen und die Kerne in die Peripherie gedrückt waren.

Die hochgradigen Reaktionen, die bei VT4 beobachtet werden konnten, führten wahrscheinlich mit dazu, dass zu den späteren Untersuchungszeitpunkten keine Zysten und auch keine Parasiten-DNA mehr in der Haut nachgewiesen wurde. Obwohl die Zysten histologisch nicht mehr nachweisbar waren, konnten dennoch in der skleralen Konjunktiva und dem *Vestibulum vaginae* Zysten weiterhin makroskopisch nachgewiesen werden. Jedoch nahm deren geschätzte Anzahl gegen Ende des Beobachtungszeitraumes ab. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich auch hier in der Zystenzerstörung durch das Immunsystem des Wirtes zu suchen.

Bei VT6 setzten die entzündlichen, perizystischen Reaktionen später ein (39 Tage nach Beginn der Fieberphase), jedoch konnte am letzten Untersuchungszeitpunkt auch hier keine Zysten mehr histologisch nachgewiesen werden. Die nachgewiesenen DNA-Mengen sanken gegen Ende des Untersuchungszeitraums deutlich ab. Auch hier könnte die Zerstörung der Zysten und Bradyzoiten durch das Immunsystem den Abfall der nachgewiesenen DNA-Mengen erklären. Auch bei diesem Tier konnten jedoch klinisch noch Zysten in der skleralen Konjunktiva nachgewiesen werden.

Die bei VT20 und VT22 erkennbaren Abnahmen der DNA-Mengen sind wahrscheinlich eher bedingt durch Unterschiede in der Verteilung der Zysten innerhalb der Haut, als durch eine Abnahme infolge der Zystenzerstörung, da auch zum Zeitpunkt der Sektion zahlreiche Zysten in der Haut vorhanden waren.

Interessanterweise konnten im chronischen Stadium in der Haut (und später bei der Sektion auch in anderen Geweben) Zysten nachgewiesen werden, die hochgradige perizystische entzündliche Infiltrate aufwiesen. Direkt daneben befanden sich Zysten, die überhaupt keine perizystischen Infiltrate aufwiesen. Diese Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren gemacht (McCully *et al.* 1966), eine schlüssige Erklärung hierfür existiert in der Literatur

jedoch nicht. Schulz schreibt, dass hochgradige entzündliche Zellinfiltrate nur in der Umgebung von rupturierten oder degenerierten Zysten zu finden sind (Schulz 1960). In dieser Untersuchung umgaben die überwiegend lymphozytären und granulomatösen Infiltrate sowohl intakte als auch zerstörte sowie reife und unreife Zysten. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Autoren (McCully *et al.* 1966). Besnoit und Robin spekulierten, dass die entzündliche Reaktion verantwortlich für den verfrühten Untergang der Parasiten ist (Besnoit und Robin 1914). Unabhängig von der perizystischen Infiltration konnte bei reifen Zysten Anzeichen einer Degeneration von Bradyzoiten festgestellt werden. Diese untergehenden Bradyzoiten waren überwiegend zentral innerhalb der parasitophoren Vakuole lokalisiert. Die Annahme, die Degeneration wäre bedingt durch Substratmangel, könnte dafür sprechen, dass die Ernährung der Bradyzoiten durch Diffusion von Nährstoffen in die parasitophore Vakuole erfolgt. Zentral gelegene Bradyzoiten besitzen die längste Distanz zum nächsten Gefäß und damit die längste Distanz, die Nährstoffe per Diffusion zurücklegen müssen. Mit zunehmendem Zystenwachstum können die Erfordernisse der zentral gelegenen Bradyzoiten nicht mehr erfüllt werden, und sie gehen zu Grunde.

4.3.1 Extrazystische Signale bei VT20

Bigalke beschreibt, dass die extrazystische Proliferation ca. drei Wochen nach Infektion endet (Bigalke 1970). Bei VT4 und VT6 wurde 27 respektive 22 Tage nach geschätztem Infektionszeitpunkt das letzte extrazystische Signal immunhistochemisch detektiert. Diese Zeitspannen liegen daher annähernd in dem von Bigalke angegebenen Bereich. Jedoch wurden bei VT20 am Tag 22 nach Vorstellung (38 beziehungsweise 51 Tage nach dem geschätzten Infektionszeitpunkt, je nach Methode der Schätzung) in einem Gefäß im *Stratum reticulare* immunhistochemisch ein eindeutiges intravasales Signal in der Tiefe sowie oberflächliche perivaskuläre Signale nachgewiesen. Da die Signale in beiden Lokalisationen die typische Morphologie von Endozoiten aufwiesen, wurden sie als Endozoitenanschnitte interpretiert.

Intravasale *B. besnoiti*-Endozoiten bei Rindern im chronischen Stadium sind beschrieben und treten unter anderem durch Ruptur von subintimalen Zysten in das Lumen der Gefäße auf (McCully *et al.* 1966). Da bei diesem Tier Zysten auch direkt subintimal in Gefäßen gefunden

wurden, sind eine Ruptur derselben und ein Eintritt der Bradyzoiten in die Blutlaufbahn wahrscheinlich.

Ob Bradyzoiten von *B. besnoiti* zu einer Reaktivierung (Konversion zu Tachyzoiten) ähnlich wie bei *T. gondii* fähig sind, ist nicht beschrieben, könnte jedoch möglich sein. Hinweisend darauf ist die Tatsache, dass sich Rinder nasal mit Zysten infizieren lassen und eine febrile Phase und nachfolgende Zystenbildung entwickeln (Bigalke 1968). Zudem lassen sich diverse Labortierspezies mit Bradyzoiten infizieren und entwickeln eine generalisierte Infektion (Schaes *et al.* 2009; Basso *et al.* 2011). Auch in mit *B. besnoiti*-Bradyzoiten infizierten Zellkulturen kommt es zu einer Vermehrung von Tachyzoiten (Schaes, persönliche Mitteilung). Ob es sich bei den nachgewiesenen Signalen um Bradyzoiten oder Tachyzoiten handelte, konnte nicht geklärt werden, da hierfür keine immunhistochemischen Marker zur Verfügung standen. Ob die Endozoiten zu einer Reinfektion und erneuten Zystenbildung befähigt sind, bleibt spekulativ. Alle Zysten waren jedoch während des gesamten Ablaufs der Zystenevolution im ungefähr gleichen Entwicklungsstadium, Hinweise auf eine Reinfektion perivaskulärer Zellen sowie eine neue Zystenbildung fanden sich nicht.

4.4 Serologie und PCR

Bei den Tieren VT4, VT8 und VT20 sank der IFAT-Titer gegen Ende des Beobachtungszeitraumes (März 2010). Eine mögliche Interpretation hierfür wäre die geringe Aktivität von potentiellen Vektoren wie hämatophage Insekten während der Wintermonate. Das Ausbleiben einer Reinfektion durch Insekten und damit das Fehlen einer erneuten Aktivierung des Immunsystems könnte die abfallenden IFAT-Titer erklären.

Diese Hypothese könnte auch das Abfallen des IFAT-Titers von VT6 im Dezember erklären, nicht jedoch das erneute Ansteigen im März. Da die DNA-Menge in der Haut zu diesem Untersuchungszeitpunkt stark abfiel, könnte ein Zusammenhang mit der Zerstörung von Zysten durch das Immunsystem bestehen. Im Rahmen der Zystenzerstörung gelangen Bradyzoiten in direkten Kontakt mit Zellen des Immunsystems oder in den Blutkreislauf und sorgen somit für eine erneute Aktivierung des Immunsystems. Möglicherweise könnte der Titer-Anstieg bei VT6 hierdurch erklärt werden.

Zeitgleich mit dem Auftreten der klinischen Symptomatik und dem immunhistochemischen Nachweis der Parasiten konnte auch mit der PCR Parasiten-DNA in der Haut nachgewiesen

werden. Passend zum histologischen Bild enthielt die Haut von VT22 und VT20 sehr viel höhere DNA-Mengen, als die von VT4 und VT6.

Sowohl bei VT4 als auch bei VT6 steigt die in der Haut nachgewiesene DNA-Menge mit Beginn der Fieberphase an, fällt danach kurz ab und steigt dann wieder an (siehe **Abbildung IV-3**, S. 77 und **Abbildung IV-7**, S. 84). Das Absinken der DNA-Menge findet zum selben Zeitpunkt statt wie die Serokonversion. Sehr wahrscheinlich werden durch eine Zunahme spezifischer Antikörper vermehrt Tachyzoiten opsonisiert und effektiv eliminiert, so dass deren DNA nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dass der sich anschließende Wiederanstieg der DNA-Mengen durch proliferierende Bradyzoiten innerhalb von Zysten verursacht wurde, ist anzunehmen, da histologisch die ersten Zysten bereits vorhanden waren und keine extrazystisch proliferierenden Parasiten mehr beobachtet werden konnten.

4.5 VT8 - Die subklinische Infektion

Die subklinische Infektion von Fleckviehkalbin VT8 wäre ohne die regelmäßigen serologischen Kontrollen unbemerkt geblieben. Die vor der Serokonversion nachgewiesenen geringen Mengen an Parasiten-DNA stammen möglicherweise aus wenigen proliferierenden Tachyzoiten. Das Tier befand sich zu diesem Zeitpunkt demnach in einem „stillen“ akuten Stadium. Die Phase der extrazystischen Proliferation der Parasiten liegt bei etwa drei Wochen, nach diesem Zeitraum findet die Bildung von Zysten statt (Bigalke 1970). Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der im Dezember 2009 in der Haut nachgewiesenen DNA um Bradyzoiten-DNA handelt. Das heißt, in der Haut dieses Tieres befanden sich wahrscheinlich einige wenige Zysten.

Nur in einer von sechs Hautproben, die nach der Serokonversion untersucht wurden, war die PCR positiv. Eine Erklärung hierfür könnte eine sehr geringe Anzahl von Zysten sein, die zufällig in der Haut verteilt sind. Das für den positiven histologischen Nachweis notwendige Zystenaufkommen war jedoch noch nicht erreicht, da in der histologischen Untersuchung keine Zysten nachgewiesen wurden.

B. besnoiti-Zysten in der Haut von chronisch infizierten Rindern können von den Mundwerkzeugen hämatophager Insekten penetriert und Bradyzoiten auf andere Rinder übertragen werden (Bigalke 1968). Somit stellt auch ein Rind mit sehr geringer Zystenanzahl in der Haut ein potentiell Reservoir für die Infektion anderer Tiere dar.

VT8 steht damit prototypisch für ein stummes Trägartier, das über klinische und histologische Untersuchungsmethoden nicht identifiziert werden kann, jedoch eine potentielle Infektionsquelle für andere Tiere darstellt. Die Untersuchung der Haut mittels PCR war in diesem Einzelfall auch nicht ausreichend, um das Tier als verlässlich positiv zu detektieren, da auch im chronischen Stadium die Anwesenheit von Zysten in der zu untersuchenden Probe zwingend notwendig für einen positiven Nachweis ist.

5 Interpretation der Befunde der GKO-Mäuse

B. besnoiti-Tachyzoiten konnten in zahlreichen Organen von GKO-Mäusen gefunden werden. Sie wiesen eine ausgesprochen hohe Affinität zu Gefäßendothelien auf. Unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters wird angenommen, dass es sich bei dem Befall mit *B. besnoiti* um ein generalisiertes Geschehen handelt und Parasiten in jedem vaskularisierten Organ nachzuweisen sind. Histologisch dominierten eher Läsionen, die von vaskulärer Natur sind.

Das gesamte Ausmaß des Befalls eines Organs konnte bereits in der Routinefärbung erahnt werden, wurde aber erst in der Immunhistochemie deutlich (siehe **Abbildung V-1**, S. 157). Vorwiegend stark vaskularisierte Organe wie Lunge und Leber waren besonders stark betroffen.

Hinweise auf eine Zystenbildung oder junge Zysten, ähnlich wie bei den Rindern, konnten nicht gefunden werden. Das könnte möglicherweise an der kurzen Überlebensdauer der infizierten Mäuse liegen, die bei allen Tieren unter vierzehn Tagen lag (Schares, persönliche Mitteilung). Somit könnte die Zeit, die für eine Ausbildung von Zysten notwendig gewesen wäre, nicht erreicht worden sein. In der Literatur gibt es bei experimentell mit *B. besnoiti* infizierten Versuchstieren nur bei Kaninchen Schilderungen über das Auftreten von Gewebezysten. Diese treten dort erst relativ spät, nämlich nach mehreren Wochen auf (Basson *et al.* 1970). In der Literatur gibt es zudem Hinweise darauf, dass Interferon γ bei *T. gondii* an der Stadien-Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten beteiligt ist (Skariah *et al.* 2010). Da GKO-Mäuse kein Interferon γ exprimieren, könnte bei mit *B. besnoiti* infizierten Mäusen eine Konversion zu Bradyzoiten und damit die Zystenbildung zusätzlich verzögert werden oder möglicherweise ausgeschlossen sein.

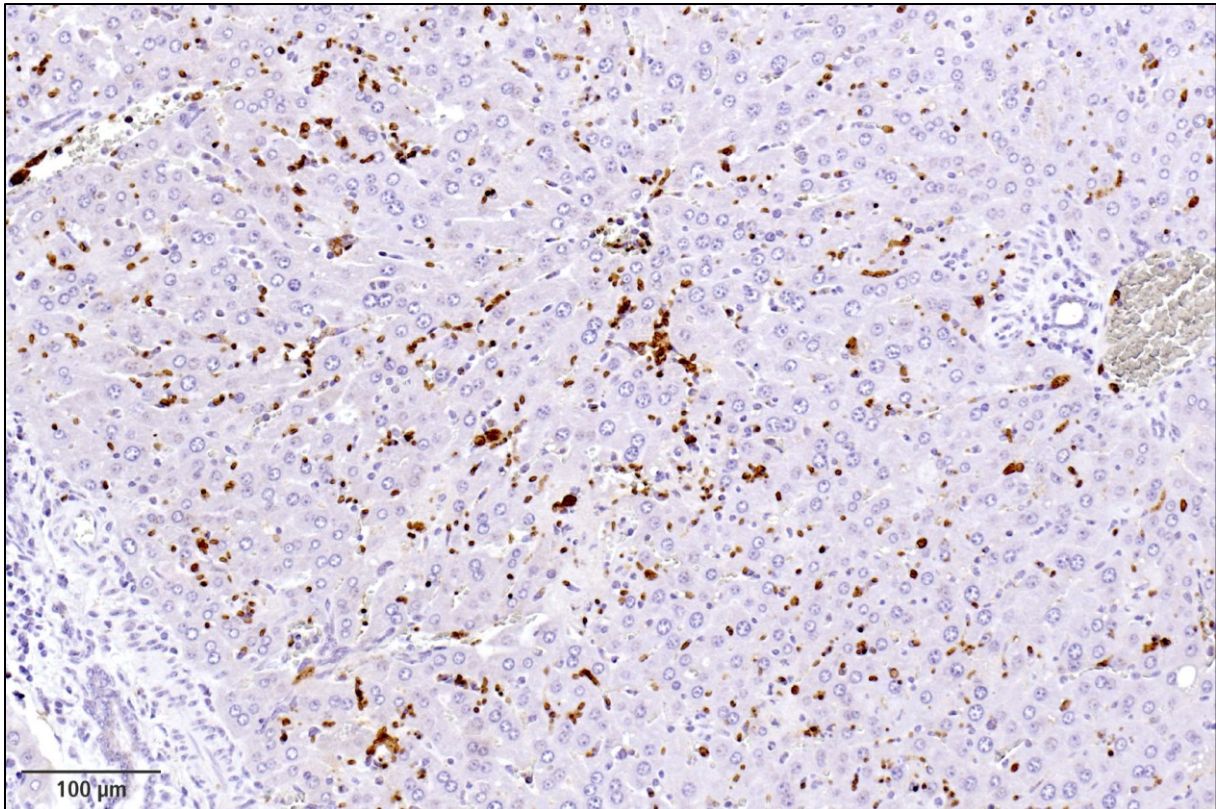


Abbildung V-1: GKO-Maus, akutes Stadium (Leber): Zahlreiche *B. besnoiti*-Tachyzoiten (braune Signale). Paraffin, Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie, Hämalan.

In der Literatur beschriebene Läsionen wie Lebernekrosen mit gemischtzelligen Infiltrationen oder Läsionen in der Lunge (Schares *et al.* 2009; Basso *et al.* 2011) konnten auch bei den untersuchten Mäusen nachgewiesen werden. Eindeutige Hinweise auf eine Entzündung des Gehirns fanden sich jedoch nicht.

Ob die Lebernekrosen durch Ischämie oder durch den Befall mit *B. besnoiti* verursacht wurden, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Jedoch konnten keine Hinweise auf eine Thrombosierung von Gefäßen gefunden werden, so dass eine Hypoxie als weniger wahrscheinlich angenommen wird.

Die hochgradige Peritonitis ist vermutlich begründet durch die intraperitoneale Inokulation der Parasiten. Das mehr oder weniger zeitgleiche Eindringen unzähliger Parasiten in Peritonealdeckzellen und -gefäße legt eine ausgeprägte Wirtsreaktion nahe.

Einige der Mäuse zeigten nur einen sehr geringen Befall mit *B. besnoiti* sowie nur geringgradige Begleitläsionen. Zwei dieser Mäuse wurden mit Zystozysten infiziert und zeigten eine Überlebenszeit von nur zwei Tagen. In diesen Fällen war wahrscheinlich eine

Kontamination der Proben mit anderen Keimen verantwortlich und die Lebenszeit der Mäuse reichte für eine massive Vermehrung der *B. besnoiti*-Tachyzoiten nicht aus. Ein weiterer Erklärungsansatz für den Effekt wäre eine mögliche unterschiedliche Virulenz verschiedener Isolate (Isolate stammten aus Deutschland sowie aus verschiedenen Regionen in Italien).

6 Elektronenmikroskopie

Tachyzoiten von *B. besnoiti* konnten sowohl in der Haut von VT20, als auch in Organen von GKO-Mäusen ultrastrukturell dargestellt werden. Gewebezysten und Bradyzoiten wurden in Haut und Faszie von VT20 und VT22 dargestellt.

Die in der Literatur beschriebenen ultrastrukturellen Merkmale von Tachyzoiten (Neuman 1974; Göbel *et al.* 1985), Bradyzoiten und Gewebezysten von *B. besnoiti* (Shkap *et al.* 1988; Dubey *et al.* 2003a; Mehlhorn *et al.* 2009) konnten auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden.

Zusätzlich konnten jedoch noch feingranulierte, elektronendichte Ablagerungen im Wirtszellzytoplasma gefunden werden, die manchmal schichtartig der parasitophoren Vakuole von außen auflagern. Hierbei handelt es sich möglicherweise um kondensierte Bestandteile von Organellen der Wirtszelle. Vermutlich sind diese Ablagerungen Begleiterscheinungen eines degenerativen Prozesses, da die Wirtszellen auch degenerierte Mitochondrien und ein abschnittsweise dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum aufwiesen.

Im Folgenden findet sich die Interpretation von weiteren Befunden, die eines besonderen Augenmerks bedürfen.

6.1 Elektronendichtes Material in Bradyzoiten

Die zwischen den Bradyzoiten aufgefundenen elektronendichten Partikel entsprachen den in der HE- und Toluidinblau-Safranin-Färbung gefundenen rundlichen Korpuskeln, die in der PAS-Reaktion deutlich positiv waren. Diese Partikel wurden abschnittsweise auch membranumgrenzt und auch innerhalb von Bradyzoiten gefunden. Es ergeben sich zwei

Möglichkeiten der Interpretation: Die elektronendichten Partikel sind Überreste von sich teilenden Bradyzoiten oder es handelt sich dabei um Überreste untergehender Parasiten.

Mehlhorn und Mitarbeiter fanden kristallines, elektronendichtes Material in der parasitophoren Vakuole und bezeichneten diese Partikel als „crystalline particles from remnants of dividing cells“ (Mehlhorn *et al.* 2009). In den Schilderungen anderer Autoren, die sich speziell mit der Multiplikation von *B. besnoiti*-Endozoiten in Zellkultur beschäftigten, findet sich jedoch kein Hinweis auf das Auftreten kristalliner Partikel im Rahmen der Endodyogenie (Göbel *et al.* 1985). Auch konnten in den eigenen Untersuchungen keine kristallinen, elektronendichten Partikel im Zusammenhang mit den Endodyogenien bei Tachyzoiten gefunden werden.

In dieser Arbeit werden daher diese Cluster von elektronendichtem Material als Überreste untergehender Bradyzoiten interpretiert. Ein paar Indizien unterstützen diese Theorie.

Die Cluster, die sich lichtmikroskopisch als grün-gräuliche Korpuskeln in den parasitophoren Vakuolen darstellten, konnten erst bei (nahezu) ausgereiften Zysten nachgewiesen werden. Sollte es sich dabei um Überreste sich teilender Parasiten handeln, ist anzunehmen, dass diese während der gesamten Zystenevolution vorhanden sind, was in diesen Untersuchungen nicht der Fall war.

In einem Bradyzoit mit intrazytoplasmatischen elektronendichten Clustern wurde ein Mitochondrium mit aufgelösten Membranen gefunden. Dies könnte auf einen degenerativen Prozess hinweisen, da Zusammenhangstrennungen der mitochondrialen Membranen bei Säugetierzellen ein charakteristisches ultrastrukturelles Merkmal von Apoptose sind (Arbustini *et al.* 2008).

Ein zeitlicher Ablauf des degenerativen Prozesses von Bradyzoiten anhand der erhobenen Befunde wäre wie folgt denkbar:

1. Zunahme des intrazytoplasmatischen elektronendichten Materials und Ausbildung von multifokalen Clustern bei gleichzeitiger Abnahme der Organellen unter Beibehaltung der typischen bananenartigen Form der Bradyzoiten.
2. Verlust weiterer Organellen und Zusammenballung des Materials zu einem voluminösen intrazytoplasmatischen Cluster sowie beginnender Abrundung des Parasitenkörpers.

3. Kompletter Verlust aller Bradyzoiten-spezifischen Merkmale und Ausbildung einer membranumgrenzten Ansammlung von elektronendichtem Material.
4. Membrandesintegration und Austreten des elektronendichten Materials in die parasitophore Vakuole.

Bei dem elektronendichten Material handelt es sich möglicherweise um kondensierte Bradyzoiten-Strukturen wie Organellen, deren Proteine sowie Membranbestandteile.

Neben der Degeneration von Bradyzoiten mit Akkumulation von elektronendichtem Material konnten auch noch degenerierte Parasiten nachgewiesen werden, die diese granulären Strukturen nicht besaßen. Sie zeigten einen Verlust von Organellen, stellenweise auch eine Desintegration der Membran und eine deutliche Aufhellung des Zytoplasmas.

6.2 Vergleich der Ultrastruktur von Tachyzoiten und Bradyzoiten

B. besnoiti-Tachyzoiten und -Bradyzoiten wiesen alle Merkmale von Kokzidien-Endozoiten auf. In Tachyzoiten aus der Rinderhaut konnten nicht alle typischen Strukturen nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich nicht das Fehlen dieser Strukturen, sondern bedingt durch die geringe Tachyzoiten-Anzahl die untersucht werden konnte und die Lage der Schnittebenen, die in den meisten Fällen nicht optimal longitudinal war.

Geringe morphologische Unterschiede existierten zwischen Tachyzoiten und Bradyzoiten sowie Unterschiede in der Anzahl an intrazytoplasmatischen Amylopektingranula. Tachyzoiten waren im Vergleich zu Bradyzoiten plumper, hatten eine eher birnenförmige Gestalt und enthielten sehr wenige oder keine Amylopektingranula. Bradyzoiten waren eher schlanker und hatten eine bananenartige oder kommaartige Form. In den meisten Bradyzoiten konnten viele Anschnitte von Amylopektingranula gefunden werden.

Diese geringen Unterschiede zwischen Tachyzoiten und Bradyzoiten sind sowohl bei den beiden *Besnoitia*-Spezies *B. bennetti* und *B. tarandi*, als auch bei *T. gondii* und *N. caninum* beschrieben (Dubey *et al.* 1998; Speer *et al.* 1999; Dubey *et al.* 2004; Dubey *et al.* 2005).

7 Histologische Diagnostik bei Verdacht auf bovine Besnoitiose

Empfehlungen für die Vorgehensweise im Verdachtsfall sind publiziert (Gollnick *et al.* 2010d; Gollnick *et al.* 2011).

Für die histologische Diagnostik empfiehlt sich für das akute Stadium und den Übergang vom akuten zum chronischen Stadium die routinemäßige Verwendung der Färbung nach Giemsa und der PAS-Reaktion, um vor allem junge Zysten leichter identifizieren zu können (siehe Abschnitt IV.5, S. 136).

Steht eine Immunhistochemie gegen *Besnoitia* spp. zur Verfügung, sollte diese angewendet werden, da Kreuzreaktionen von Antikörpern zwischen unterschiedlichen *Besnoitia*-Spezies publiziert sind (Dubey und Yabsley 2010).

Eine erhebliche diagnostische Erleichterung stellen dünne Schnitte oder die Verwendung einer Kunststoffeinfbettung (Hermanns *et al.* 1981) dar. Alternativ zu den Kunststoffschnitten können auch Semidünnschnitte verwendet werden, der Nachteil hiervon ist jedoch die geringe Anschnittsfläche.

In allen Fällen ist das Anfertigen von Serienschnitte empfehlenswert, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Parasiten oder Gewebezysten anzuschneiden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die bovine Besnoitiose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch den protozoären Parasiten *Besnoitia besnoiti* hervorgerufen wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die klinischen und pathomorphologischen Veränderungen im akuten und chronischen Stadium der bovinen Besnoitiose nach natürlicher Infektion zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurden in einem Übertragungsversuch chronisch infizierte Limousinrinder mit fünf naiven Fleckviehkalbinnen und einem naiven Fleckviehbullen auf eine Weide gestellt. Die Tiere wurden täglich untersucht und in regelmäßigen Abständen wurden Haut- und Blutproben entnommen.

Die Infektion konnte bei zwei Fleckviehkalbinnen sowohl klinisch als auch serologisch, histologisch und mittels Nachweis von Parasiten-DNA via PCR aus der Haut bestätigt werden. Eine Fleckviehkalbin zeigte keine klinischen und histologischen Anzeichen einer Infektion, der Nachweis derselben konnte jedoch mittels Serologie und PCR erbracht werden. Darüber hinaus konnte bei zwei weiteren Limousinrindern der Verlauf der Infektion dokumentiert werden.

Klinische Veränderungen des akuten Stadiums wie Fieber, Ödeme, Nasen- und Augenausfluss sowie Beeinträchtigungen des Gangbildes konnten beobachtet werden. Veränderungen des chronischen Stadiums wie Verdickung der Haut und Gewebezysten in der skleralen Konjunktiva wurden bei mehreren Tieren nachgewiesen.

Histologisch zeigte die Haut im akuten Stadium diffuse Ödematisierung, bis hochgradige entzündliche Zellinfiltrationen und zahlreiche intravasal, intraendothelial und perivaskulär gelegene Tachyzoiten.

Zur histologischen Darstellung der *B. besnoiti*-Tachyzoiten wurde an Paraffin-eingebettetem Material von Rindern und experimentell infizierten γ -Interferon-Knock-out-Mäusen (GKO-Mäusen) unter Verwendung eines Antiserums eines experimentell infizierten Kaninchens eine Anti-*Besnoitia*-Immunhistochemie etabliert. In den Organen der experimentell infizierten GKO-Mäuse konnten Tachyzoiten und in der Rinderhaut Tachyzoiten sowie Bradyzoiten von *B. besnoiti* immunhistochemisch dargestellt werden. Auf die Verwendung der Immunhistochemie an GMA/MMA- und Semidünnschnitten wurde aufgrund hohen Antikörperverbrauchs und unbefriedigender Resultate verzichtet.

Die Entwicklung der *B. besnoiti*-Gewebezysten konnte von verhältnismäßig kleinen hypertrophierten Wirtszellen bis zu großen Gewebezysten mit zahlreichen Bradyzoiten und typischer Wandschichtung dargestellt werden. Die Reaktion des Immunsystems des Wirtes bestand aus einer überwiegend T-zellulären, histiozytären und eosinophil-granulozytären, perizystischen Zellinfiltration, die letztendlich in einer Zerstörung der Zysten gipfelte.

Zwei chronisch mit *B. besnoiti* infizierte Limousinrinder wurden aufgrund tiefreichender, komplizierter Klauengeschwüre euthanasiert und anschließend seziiert. Eine unregelmäßige Verteilung der Gewebezysten wurde festgestellt: im Gegensatz zu den Organen der Körperhöhle waren äußere Haut, lockeres Bindegewebe und Faszie besonders reich an Zysten. Insbesondere an den distalen Gliedmaßen und in den Lamellen der Klauenlederhaut fanden sich zahlreiche Zysten.

Transmissionselektronenmikroskopisch konnten erstmalig *B. besnoiti*-Tachyzoiten in der Rinderhaut und in Organen experimentell infizierter GKO-Mäuse dargestellt werden. Ferner wurden *B. besnoiti*-Bradyzoiten und -Gewebezysten elektronenoptisch dargestellt. Die Ultrastruktur der Endozoiten entsprach dem klassischen Aufbau apikomplexer Parasiten unter anderem mit Konoid, Rhoptrien, Mikronemen, Mitochondrium und dichten Granula.

VII. SUMMARY

The causative agent of the protozoan disease bovine besnoitiosis is *Besnoitia besnoiti* an apicomplexan parasite. Description of clinical and pathological changes in the two different stages (acute and chronic) of bovine besnoitiosis after naturally acquired infection was the objective of the present dissertation. To achieve natural transmission a transmission trial was conducted: five chronically infected Limousin cows were kept together on a pasture with five naive German Simmental heifers and one naive German Simmental bull. All German Simmentals were examined daily and blood and skin samples were taken in regular intervals.

Infection of two German Simmental heifers was monitored clinically and histologically. Confirmation of infection was provided by serology and by detection of parasite DNA via PCR in skin samples. One German Simmental heifer showed no clinical signs and no detectable parasites in histology. Infection of this animal was demonstrated by serology and PCR. Furthermore, progression of infection could be monitored in two Limousin cows.

Signs of acute bovine besnoitiosis were amongst others fever, oedema, nasal and ocular discharge as well as lameness. In the chronic stage of the disease thickening and folding of the skin plus parasitic cysts in the scleral conjunctiva were demonstrated.

During the acute stage of the disease, diffuse oedema, up to severe inflammatory infiltration and numerous tachyzoites were present in histological skin sections. Tachyzoites were found within endothelial cells and vessels as well as in the vicinity of the latter.

To demonstrate tachyzoites in histological sections an anti-*Besnoitia*-immunohistochemistry was established using antiserum of an experimentally infected rabbit on paraffin-embedded material of cattle and experimentally infected γ -interferon knock out mice (GKO mice).

Tachyzoites of *B. besnoiti* were demonstrated via immunohistochemistry in organs of the experimentally infected GKO mice. Tachyzoites and bradyzoites of *B. besnoiti* were demonstrated via immunohistochemistry in bovine skin samples. The employment of this method on plastic and semithin sections did not produce satisfactory results and involved large antibody consumption and was therefore dismissed.

The evolution of *B. besnoiti* tissue cysts was described starting with relatively small hypertrophied host cells and finishing with large tissue cysts harbouring numerous bradyzoites surrounded by the typical multi-layered wall. The host immune response consisted mainly of T-lymphocytes, histiocytes, multinucleated giant cells and eosinophils surrounding the cysts and leading to their ultimate destruction.

The two Limousin cows, chronically infected with *B. besnoiti*, suffered from untreatable deep claw ulcers and had to be euthanized. Both animals were subsequently necropsied. Cyst distribution differed between large amounts in skin, loose connective tissue and fascia and organs of the body cavities, which contained few or none cysts. Tissues of the distal limbs were particularly parasitized as well as the laminar corium.

Tachyzoites of *B. besnoiti* could be demonstrated in bovine skin and organs of experimentally infected GKO mice for the first time via transmission electron microscopy. In addition *B. besnoiti* bradyzoites and tissue cysts were demonstrated electron-optically. Ultrastructure of the endozoites matched the classic composition of apicomplexan parasites including conoid, rhoptries, mikronemes, mitochondrion and dense granules.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Agosti, M., A. Belloli, M. Morini und G. Vacirca (1994). "Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosis in bovini da carne importati." Praxis **15**: 5-6.
- Arbustini, E., A. Brega und J. Narula (2008). "Ultrastructural definition of apoptosis in heart failure." Heart Fail Rev **13**(2): 121-35.
- Basso, W., G. Schares, N. S. Gollnick, M. Rutten und P. Deplazes (2011). "Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* - Experimental infection of putative definitive and intermediate host species." Vet Parasitol **178**(3-4): 223-34.
- Basson, P. A., R. M. McCully und R. D. Bigalke (1970). "Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits." Onderstepoort J Vet Res **37**(2): 105-26.
- Besnoit, C. und V. Robin (1912). "Sarcosporidiose cutanée chez une vache." Rev Vét **37**: 649-63.
- Besnoit, C. und V. Robin (1914). "Les lésions de la sarcosporidiose cutanée des bovins dans leurs rapports avec l'histogénèse du tubercule." Rev Vét **71**: 193-207.
- Bigalke, R. D. (1967). "The artificial transmission of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from chronically infected to susceptible cattle and rabbits." Onderstepoort J Vet Res **34**(2): 303-16.
- Bigalke, R. D. (1968). "New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations." Onderstepoort J Vet Res **35**(1): 3-137.
- Bigalke, R. D. (1970). "The present concept of the life cycle of *Besnoitia besnoiti* of cattle." J Parasitol **56**(4): 29-30.
- Bigalke, R. D. (1981). *Besnoitiosis and Globidiosis. Diseases of Cattle in Tropics*. M. Ristic und I. McIntyre. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers. **6**: 429-42.
- Bigalke, R. D., P. A. Basson, R. M. McCully, P. P. Bosman und J. H. Schoeman (1974a). "Studies in cattle on the development of a live vaccine against bovine besnoitiosis." J S Afr Vet Assoc **45**: 207-09.
- Bigalke, R. D., J. H. Schoeman und R. M. McCully (1974b). "Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of *Besnoitia besnoiti* grown in cell cultures. 1. Studies on rabbits." Onderstepoort J Vet Res **41**(1): 1-5.
- Blackman, M. J. und L. H. Bannister (2001). "Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation." Mol Biochem Parasitol **117**(1): 11-25.
- Böck, P. (1984). *Immunhistochemie an Semidünnschnitten. Der Semidünnschnitt*. München, J. F. Bergmann Verlag: 141-46.

Castillo, J. A., J. M. Marcén, L. M. Ortega-Mora und G. Álvarez García (2009). "La besnoitiosis bovina como una enfermedad emergente en Europa." Albéitar **127**: 24-25.

Cheema, A. H. und F. Toofanian (1979). "Besnoitiosis in wild and domestic goats in Iran." Cornell Vet **69**(3): 159-68.

Cilek, J. E. (1999). "Evaluation of various substances to increase adult *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) collections on alsynite cylinder traps in north Florida." J Med Entomol **36**(5): 605-9.

Cortes, H., J. Chagas e Silva, M. C. Baptista, R. M. Pereira, A. Leitao, A. E. M. Horta, M. I. Vasques, J. P. Barbas und C. C. Marques (2006a). "Besnoitia besnoiti impact on fertility of cattle exploited in Mediterranean pastures (Alentejo)." Animal products from the Mediterranean area **119**: 323-29.

Cortes, H., A. Leitao, R. Vidal, M. J. Vila-Vicosa, M. L. Ferreira, V. Caeiro und C. A. Hjerpe (2005). "Besnoitiosis in bulls in Portugal." Vet Rec **157**(9): 262-4.

Cortes, H., F. Nóbrega, R. Vidal, M. L. Ferreira und V. Caeiro (2003). "Contribuicao para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal." Rev Port Cienc Vet **98**: 43-46.

Cortes, H. C., N. Mueller, M. Esposito, A. Leitao, A. Naguleswaran und A. Hemphill (2007a). "In vitro efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells." Parasitology **134**(Pt 7): 975-85.

Cortes, H. C., S. Nunes, Y. Reis, D. Staubli, R. Vidal, H. Sager, A. Leitao und B. Gottstein (2006b). "Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot." Vet Parasitol **141**(3-4): 216-25.

Cortes, H. C., Y. Reis, B. Gottstein, A. Hemphill, A. Leitao und N. Müller (2007b). "Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies." Vet Parasitol **146**(3-4): 352-6.

Cortes, H. C., Y. Reis, H. Waap, R. Vidal, H. Soares, I. Marques, I. Pereira da Fonseca, I. Fazendeiro, M. L. Ferreira, V. Caeiro, V. Shkap, A. Hemphill und A. Leitao (2006c). "Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal." Vet Parasitol **141**(3-4): 226-33.

de Souza, W. (2006). "Secretory organelles in parasitic protozoa." An Acad Bras Cienc **78**(2): 271-91.

de Souza, W. (2008). "An introduction to the structural organization of parasitic protozoa." Curr Pharm Des **14**(9): 822-38.

Diesing, L., A. O. Heydorn, F. R. Matuschka, C. Bauer, E. Pipano, D. T. de Waal und F. T. Potgieter (1988). "*Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle." Parasitol Res **75**(2): 114-7.

Dubey, J. P. und D. S. Lindsay (2003). "Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites." Int J Parasitol **33**(8): 807-19.

- Dubey, J. P., D. S. Lindsay und C. A. Speer (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-99.
- Dubey, J. P., V. Shkap, E. Pipano, L. Fish und D. L. Fritz (2003a). "Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoites." J Eukaryot Microbiol **50**(4): 240-4.
- Dubey, J. P., C. Sreekumar, T. Donovan, M. Rozmanec, B. M. Rosenthal, M. C. Vianna, W. P. Davis und J. S. Belden (2005). "Redescription of *Besnoitia bennetti* (Protozoa: Apicomplexa) from the donkey (*Equus asinus*)." Int J Parasitol **35**(6): 659-72.
- Dubey, J. P., C. Sreekumar, D. S. Lindsay, D. Hill, B. M. Rosenthal, L. Venturini, M. C. Venturini und E. C. Greiner (2003b). "*Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits." Parasitology **126**(6): 521-39.
- Dubey, J. P., C. Sreekumar, B. M. Rosenthal, M. C. Vianna, M. Nylund, S. Nikander und A. Oksanen (2004). "Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*)." Int J Parasitol **34**(11): 1273-87.
- Dubey, J. P. und M. J. Yabsley (2010). "*Besnoitia neotomofelis* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*)." Parasitology **137**(12): 1731-47.
- Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, V. Conseil und M. N. Fourmaux (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." Int J Parasitol **28**(7): 1007-13.
- Eckert, J., K. T. Friedhoff, H. Zahner und P. Deplazes (2008). Glossar. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Stuttgart, Enke Verlag: 554-65.
- Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver und G. Webster (1989). "A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows." J Dairy Sci **72**(1): 68-78.
- EFSA-Statement (2010). "Bovine Besnoitiosis: An emerging disease in Europe." EFSA Journal **8**(2): 1499.
- Euzéby, J. (1987). Vol II: Myxozoa - Microspora - Ascetospora - Apicomplexa, 1: Coccidioses (Sensu Lato). Protozoologie médicale comparée. Les protozooses des animaux et leurs relations avec les protozooses de l'homme (avec étude des arthropodes hématophages vecteurs de protozoaires), Fondation Marcel Mérieux: 363-75.
- Fernández-García, A., G. Álvarez-García, V. Risco-Castillo, A. Aguado-Martínez, J. M. Marcén, S. Rojo-Montejo, J. A. Castillo und L. M. Ortega-Mora (2010). "Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain." Vet Rec **166**(26): 818-22.
- Fernández-García, A., G. Álvarez-García, V. Risco-Castillo, A. Aguado-Martínez, V. Marugán-Hernández und L. M. Ortega-Mora (2009). "Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle." Vet Parasitol **164**(2-4): 104-10.
- Fernandez-Garcia, A., V. Risco-Castillo, S. Pedraza-Diaz, A. Aguado-Martinez, G. Alvarez-Garcia, M. Gomez-Bautista, E. Collantes-Fernandez und L. M. Ortega-Mora (2009). "First

isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain." J Parasitol **95**(2): 474-6.

Férrie, J. J. (1984). "La besnoitiose bovine: revue bibliographique, observations personnelles." École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Université de Toulouse, 288.

Fouquet, C. M. (2009). "La besnoitiose bovine: suivi épidémiologique de l'épizootie de la région PACA." École Nationale Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, 106.

Franc, M., J.-M. Gourreau und J. Ferrie (1987). "La besnoitiose bovine." Le point Vet **19**(107): 445-55.

Franko, E. E. und I. Borges (1915). "Sur la sarcosporidiose bovine." Arq Inst Bac Camera Pestana: 269-89.

Freudiger, I. (2008). "La besnoitiose bovine: étude épidémiologique de l'épizootie des Alpes-de-Haute-Provence et des Hautes-Alpes." Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, 85.

Frölich, S., R. Entzeroth und M. Wallach (2012). "Comparison of protective immune responses to apicomplexan parasites." J Parasitol Res **2012**: 852591.

Gentile, A., G. Militerno, P. Bassi, G. Schares, M. Majzoub und N. S. Gollnick (2010). "Su di un episodio di besnoitiosi bovina in Italia." Buiatria - J Ital Ass Buiatrics **5**(1): 3-15.

Gentile, A., G. Militerno, G. Schares, A. Nanni, S. Testoni, P. Bassi und N. S. Gollnick (2012). "Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy - First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy." Vet Parasitol **184**(2-4): 108-15.

Göbel, E., R. Widauer, M. Reimann und E. Munz (1985). "Ultrastructure of the asexual multiplication of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) in Vero- and CRFK-cell cultures." Zentralbl Veterinarmed B **32**(3): 202-12.

Goldman, M. und E. Pipano (1983). "Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel." Trop Anim Health Prod **15**(1): 32-8.

Gollnick, N. S., A. Gentile und G. Schares (2010a). "Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy." Vet Rec **166**(19): 599.

Gollnick, N. S., W. Klee, M. Majzoub, A. Rostaher, B. Bauer, W. Basso, F. J. Conraths und G. Schares (2010b). "Besnoitia besnoiti: Über das Risiko der Ausbreitung in Deutschland." DTB **3**: 338-41.

Gollnick, N. S., W. Klee, A. Rostaher, M. Majzoub, J. Selmaier, W. Basso und G. Schares (2010c). "Die leise Bedrohung: Bovine Besnoitiose in Deutschland." KTP **18**(2): 41-45.

Gollnick, N. S., W. Klee, J.-C. Scharr, M. C. Langenmayer, M. Majzoub, A. Rostaher, W. Basso, F. J. Conraths und G. Schares (2010d). "Besnoitia besnoiti auf der Spur - Ein Diagnostikleitfaden." DTB **4**: 482-91.

Gollnick, N. S., A. Rostaher, J. C. Scharr, M. C. Langenmayer, M. Majzoub, B. Bauer, W. Basso, F. J. Conraths und G. Schares (2011). "Bovine Besnoitiose breitet sich in Europa aus - was tun im Verdachtsfall?" KTP **19**: 8-12.

Hermanns, W., K. Liebig und L. C. Schulz (1981). "Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritis using plastic embedded whole joints." Histochemistry **73**(3): 439-46.

Hussein, M. F. und E. M. Haroun (1975). "Bovine cutaneous besnoitiosis in the Sudan: a case report." Br Vet J **131**(1): 85-8.

Irigoiien, M., E. Del Cacho, M. Gallego, F. Lopez-Bernad, J. Quilez und C. Sanchez-Acedo (2000). "Immunohistochemical study of the cyst of *Besnoitia besnoiti*." Vet Parasitol **91**(1-2): 1-6.

Jacquet, P., E. Lienard und M. Franc (2010). "Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects." Vet Parasitol **174**(1-2): 30-6.

Janitschke, K., A. J. De Vos und R. D. Bigalke (1984). "Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests." Onderstepoort J Vet Res **51**(4): 239-43.

Kaggwa, E., G. Weiland und M. Rommel (1979). "*Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia jellisoni*: A comparison of the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in diagnosis of *Besnoitia* infections in rabbits and mice." Bull Anim Hlth Prod Afr **27**: 127-37.

Kaya, G. (2001). "An overview of classification of the phylum apicomplexa." Kafkas Üniv Vet Fak Derg **7**(2): 223-28.

Kiehl, E., A. O. Heydorn, E. Schein, K. A. Al-Rasheid, J. Selmair, F. Abdel-Ghaffar und H. Mehlhorn (2010). "Molecular biological comparison of different *Besnoitia* species and stages from different countries." Parasitol Res **106**(4): 889-94.

Kumi-Diaka, J., S. Wilson, A. Sanusi, C. E. Njoku und D. I. Osori (1981). "Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system." Theriogenology **16**(5): 523-30.

Legrand, P. L. A. (2002). "La besnoitiose bovine en Ariège." École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Université de Toulouse, 88.

Leighton, F. A. und A. A. Gajadhar (2001). *Besnoitia* spp. and Besnoitiosis. Parasitic Diseases of Wild Mammals. W. M. Samuel, M. J. Pybus und A. A. Kocan. Ames, Blackwell Publishing Company: 468-78.

Levine, N. D. (1973). *Sarcocystis, Toxoplasma*. Protozoan Parasites. Minneapolis, Burgess Publishing Company: 307-16.

Liénard, E., A. Salem, C. Grisez, F. Prevot, J. P. Bergeaud, M. Franc, B. Gottstein, J. P. Alzieu, Y. Lagalisse und P. Jacquet (2011). "A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France." Vet Parasitol **177**(1-2): 20-7.

Majzoub, M., W. Breuer, N. S. Gollnick, A. Rostaher, G. Schares und W. Hermanns (2010). "Ein Ausbruch von Besnoitiose bei Rindern in Deutschland: pathomorphologische, ultrastrukturelle und molekularbiologische Untersuchungen." Wien Tierärztl Mschr **97**: 9-15.

Manuali, E., E. Lepri, S. Salamida, N. D'Avino, P. Mangili, G. Vitellozzi, V. Grelloni und G. Filippini (2011). "An outbreak of bovine besnoitiosis in beef cattle born in central Italy." Transbound Emerg Dis **58**(5): 464-7.

McCully, R. M., P. A. Basson, J. W. Van Niekerk und R. D. Bigalke (1966). "Observations on Besnoitia cysts in the cardiovascular system of some wild antilopes and domestic cattle." Onderstepoort J Vet Res **33**: 245-76.

Mehlhorn, H., S. Klimpel, E. Schein, A. O. Heydorn, S. Al-Quraishy und J. Selmair (2009). "Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study." Parasitol Res **104**(4): 861-8.

Morrisette, N. S. und L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 21-38.

Mulisch, M. und U. Welsch (2010). Färbungen. Romeis Mikroskopische Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 181-297.

Mutinelli, F., E. Schiavon, L. Ceglie, M. Fasolato, A. Natale, F. Rampin und A. Carminato (2011). "Bovine besnoitiosis in imported cattle in Italy." Vet Parasitol **178**(1-2): 198.

Neuman, M. (1962). "The Experimental Infection of the Gerbil (*Meriones tristrami shawii*) with Besnoitia besnoiti." Refuah Veterinarith **19**: 184-88.

Neuman, M. (1965). "Infection of Laboratory White Mice with Besnoitia besnoiti." Refuah Veterinarith **22**(3): 201-05.

Neuman, M. (1972a). "Pathological changes causing sterility in bulls affected with Besnoitia besnoiti (Marotel 1912)." J Protozool **19** (Suppl. Abstr. No 154): 54.

Neuman, M. (1972b). "Serological survey of Besnoitia besnoiti (Marotel 1912) infection in Israel by immunofluorescence." Zentralbl Veterinarmed B **19**(5): 391-6.

Neuman, M. (1974). "Cultivation of Besnoitia besnoiti Marotel, 1912, in cell culture." Tropenmed Parasitol **25**(2): 243-49.

Neuman, M. und T. A. Nobel (1981). "Observations on the pathology and besnoitiosis in experimental animals." Zentralbl Veterinarmed B **28**(5): 345-54.

Nichols, B. A., M. L. Chiappino und G. R. O'Connor (1983). "Secretion from the rhoptries of Toxoplasma gondii during host-cell invasion." J Ultrastruct Res **83**(1): 85-98.

Njagi, O. N., R. Entzeroth, P. N. Nyaga und A. J. Musoke (2007). "The Ultrastructural Dynamics of Parasite-Host Cell Interactions as demonstrated in *Besnoitia besnoiti* (Apicomplexa, Protozoa)." The Kenya Veterinarian **31**(1): 14-19.

Njagi, O. N., C. M. Ndarathi, P. N. Nyaga und L. K. Munga (1998). "An epidemic of besnoitiosis in cattle in Kenya." Onderstepoort J Vet Res **65**(2): 133-6.

Njenga, J. M., O. Bwangamoi, E. K. Kangethe, G. M. Mugera und E. R. Mutiga (1995). "Comparative ultrastructural studies on *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia caprae*." Vet Res Commun **19**(4): 295-308.

Nobel, T. A., U. Klopfer, S. Perl, A. Nyska, M. Neumann und G. Brenner (1981). "Histopathology of genital besnoitiosis of cows in Israel." Vet Parasitol **8**(4): 271-76.

Nobel, T. A., M. Neumann, U. Klopfer und S. Perl (1977). "Kystes de *Besnoitia besnoiti* dans les organes génitaux de la vache." Bull Acad Vet de France **50**: 569-74.

Olias, P., B. Schade und H. Mehlhorn (2011). "Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae)." Infect Genet Evol **11**(7): 1564-76.

Peteshev, V. M., I. G. Galuzo und A. P. Polomoshnov (1974). "Cats - definitive hosts of *Besnoitia* (*Besnoitia besnoiti*)." Azv Akad Nauk Kazakh SSR B **1**: 33-38.

Pipano, E. (1997). "Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance." Trop Anim Health Prod **29**(4 Suppl): 86S-90S.

Pols, J. (1960). "Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology." Onderstepoort J Vet Res **28**: 265-356.

Proellocks, N. I., R. L. Coppel und K. L. Waller (2010). "Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins." Trends Parasitol **26**(6): 297-304.

Reis, Y., H. Cortes, L. Viseu Melo, I. Fazendeiro, A. Leitao und H. Soares (2006). "Microtubule cytoskeleton behavior in the initial steps of host cell invasion by *Besnoitia besnoiti*." FEBS Lett **580**(19): 4673-82.

Rommel, M. (1975). "[New knowledge on the biology of *Coccidia*, *Toxoplasma*, *Sarcosporidia* and *Besnoitia*]." Berl Münch Tierärztl Wochenschr **88**(6): 112-7.

Rostaher, A., R. S. Müller, M. Majzoub, G. Schares und N. S. Gollnick (2010). "Bovine besnoitiosis in Germany." Vet Dermatol **21**(4): 329-39.

Sannusi, A. (1991). "A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis." Vet Parasitol **39**(1-2): 185-8.

Santos, J. M. und D. Soldati-Favre (2011). "Invasion factors are coupled to key signalling events leading to the establishment of infection in apicomplexan parasites." Cell Microbiol **13**(6): 787-96.

Schares, G., W. Basso, M. Majzoub, H. C. Cortes, A. Rostaher, J. Selmair, W. Hermanns, F. J. Conraths und N. S. Gollnick (2009). "First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany." Vet Parasitol **163**(4): 315-22.

Schares, G., W. Basso, M. Majzoub, A. Rostaher, J.-C. Scharr, M. C. Langenmayer, J. Selmair, J. P. Dubey, H. C. Cortes, F. J. Conraths und N. S. Gollnick (2010). "Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot test for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera." Vet Parasitol **171**(1-2): 32-40.

Schares, G., W. Basso, M. Majzoub, A. Rostaher, J. C. Scharr, M. C. Langenmayer, J. Selmair, J. P. Dubey, H. C. Cortes, F. J. Conraths, T. Haupt, M. Purro, A. Räber, P. Buholzer und N. S. Gollnick (2011a). "Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*." Vet Parasitol **175**(1-2): 52-9.

Schares, G., A. Maksimov, W. Basso, G. More, J. P. Dubey, B. Rosenthal, M. Majzoub, A. Rostaher, J. Selmair, M. C. Langenmayer, J. C. Scharr, F. J. Conraths und N. S. Gollnick (2011b). "Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle." Vet Parasitol **178**(3-4): 208-16.

Schulz, K. C. A. (1960). "A report on naturally acquired besnoitiosis with special reference to its pathology." J S Afr Vet Med Assoc **31**: 21-35.

Sekoni, V. O., A. Sanusi, M. O. I. Abatan, E. O. Oyedipe, P. I. Rekwot und L. O. Eduvie (1992). "Loss of libido and terminal sterility in a friesian bull naturally infected with *Besnoitia besnoiti* in Northern Nigeria." Theriogenology **37**(2): 533-49.

Shkap, V. (1985). "Chemotherapy of experimental *Besnoitia besnoiti* infection in rabbits." Onderstepoort J Vet Res **52**: 289.

Shkap, V. und E. Pipano (1993). "The route of immunization of gerbils with live *Besnoitia besnoiti* as a factor in protection against lethal challenge." Vet Parasitol **51**(1-2): 27-33.

Shkap, V., E. Pipano und C. Greenblatt (1987a). "Cultivation of *Besnoitia besnoiti* and evaluation of susceptibility of laboratory animals to cultured parasites." Vet Parasitol **23**(3-4): 169-78.

Shkap, V., E. Pipano, S. Marcus und Y. Krigel (1994). "Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection." Onderstepoort J Vet Res **61**(3): 273-5.

Shkap, V., E. Pipano und H. Ungar-Waron (1987b). "*Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials in vivo and in vitro." Rev Elev Med Vet Pays Trop **40**(3): 259-64.

Shkap, V., A. Reske, E. Pipano, L. Fish und T. Baszler (2002). "Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*." Vet Parasitol **106**(1): 35-43.

Shkap, V., H. Ungar-Waron, E. Pipano und C. Greenblatt (1984). "Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle." Trop Anim Health Prod **16**(4): 233-8.

Shkap, V., B. A. Yakobson und E. Pipano (1988). "Transmission and scanning electron microscopy of *Besnoitia besnoiti*." Int J Parasitol **18**(6): 761-6.

- Skariah, S., M. K. McIntyre und D. G. Mordue (2010). "Toxoplasma gondii: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion." Parasitol Res **107**(2): 253-60.
- Soldati-Favre, D. (2008). "Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome." Parasite **15**(3): 197-205.
- Soldati, D., B. J. Foth und A. F. Cowman (2004). "Molecular and functional aspects of parasite invasion." Trends Parasitol **20**(12): 567-74.
- Soulsby, E. J. L. (1968). Protozoa. Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals. London, Baillière, Tindall and Cassell: 750-51.
- Speer, C. A., J. P. Dubey, M. M. McAllister und J. A. Blixt (1999). "Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of Neospora caninum and Toxoplasma gondii." Int J Parasitol **29**(10): 1509-19.
- Sprecher, D. J., D. E. Hostetler und J. B. Kaneene (1997). "A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance." Theriogenology **47**(6): 1179-87.
- Tenter, A. M., J. R. Barta, I. Beveridge, D. W. Duszynski, H. Mehlhorn, D. A. Morrison, R. C. Thompson und P. A. Conrad (2002). "The conceptual basis for a new classification of the coccidia." Int J Parasitol **32**(5): 595-616.
- Tenter, A. M. und T. Schnieder (2006). Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. Veterinärmedizinische Parasitologie. T. Schnieder. Berlin, Parey: 30-34.

IX. ANHANG

1 Tabellen

Tabelle IX-1: VT4, Befunde der klinischen Untersuchungen: Verhalten (1 = aufmerksam; 2 = niedergeschlagen), BCS (nach Edmonson *et al.* 1989), Schleimhäute (1 = blass; 2 = blassrosa; 3 = rosa), Episkleralgefäße (1 = fein gezeichnet; 2 = mäßig gezeichnet; 3 = gut gezeichnet; 4 = injiziert; 5 = injiziert/verwaschen), Pansenfüllung (1 = schlecht gefüllt; 2 = mäßig gefüllt; 3 = gut gefüllt), Gangbild (nach Sprecher *et al.* 1997), Lymphknoten (0 = keine Veränderung; 1 = vergrößert und palpatorisch verändert), Haut/Unterhautödeme (0 = keine Veränderungen), Zysten (0 = keine Zysten; 1 = 1-5 Stück; 2 = 6-10 Stück).

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Episkleralgefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
06.08.2009	1		38,4	2	1	72	32	3	1	0	0	0	0	0	465
07.08.2009	1		38,4	2	2	68	28	3	1						
08.08.2009	1		38,3	2	1	72	36	3	1						
09.08.2009	1		38,5	2	2	76	36	3	1						
10.08.2009	1	3,75	38,4	2	2	68	36	3	1	0	0	0	0	0	478
11.08.2009	1		38,3	2	1	84	32	3	1						
12.08.2009	1		38,3	2	1	64	24	3	1						
13.08.2009	1	3,5	38,9	2	1	64	40	3	1	0	0	0	0	0	497
14.08.2009	1		38,4	2	1	72	32	2	1						
15.08.2009	1		38,5	2	2	88	40	3	1						
16.08.2009	1		38,2	2	1	64	28	2	1						
17.08.2009	1	3,5	38,1	2	2	64	36	3	1	0	0	0	0	0	509
18.08.2009	1		38,5	2	2	80	36	3	1						
19.08.2009	1		38,7	2	2	60	28	3	1						
20.08.2009	1	3,75	38,3	2	1	64	28	3	1	0	0	0	0	0	525
21.08.2009	1		38,7	2	1	76	36	2	1						
22.08.2009	1		39,3	2	1	80	28	3	1						
23.08.2009	1		39,6	2	2	80	24	3	1						
24.08.2009	1	3,75	38,4	2	2	68	32	3	1	0	0	0	0	0	543
25.08.2009	1		38,5	2	2	76	28	2	1						
26.08.2009	1		38,4	2	2	76	32	2	1						
27.08.2009	1	3,5	39,2	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	0	558
28.08.2009	1		38,4	2	3	88	36	2	1						
29.08.2009	1		38,4	2	3	76	32	2	1						
30.08.2009	1		38,2	2	2	80	28	3	1						
31.08.2009	1	3,5	38,0	2	3	72	24	3	1	0	0	0	0	0	576
01.09.2009	1		38,4	2	2	88	36	3	1						
02.09.2009	1		38,5	2	3	88	32	3	1						
03.09.2009	1	3,5	38,4	2	2	72	32	3	1	0	0	0	0	0	592
04.09.2009	1		38,5	2	3	80	32	2	1						
05.09.2009	1		38,3	2	3	76	28	3	1						
06.09.2009	1		39,2	2	2	84	32	3	1						
07.09.2009	1	3,5	38,1	2	2	80	32	3	1	0	0	0	0	0	607
08.09.2009	1		38,3	2	1	76	32	3	1						
09.09.2009	1		38,3	2	2	76	24	3	1						
10.09.2009	1	3,75	38,6	2	2	76	32	3	1	0	0	0	0	0	624
11.09.2009	1		38,2	2	2	80	36	3	1						
12.09.2009	1		38,2	2	2	80	28	3	1						
13.09.2009	1		38,3	2	3	72	24	3	1						
14.09.2009	1	4	38,7	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	0	635
15.09.2009	1		38,6		1				1						
16.09.2009	1		38,4		2				1						
17.09.2009	1	3,75	38,4	2	2	80	32	3	1	0	0	0	0	0	647
18.09.2009	1		38,3		1				1						
19.09.2009	1		38,3		1				1						
20.09.2009	1		38,4		2				1						
21.09.2009	1	3,75	38,9	2	1	76	28	3	1	0	0	0	0	0	667
22.09.2009	1		39,1		1				1						
23.09.2009	1	4	40,7	2	2	88	28	2	1	0	0	0	0	0	669
24.09.2009	1	3,75	41,0	2	3	84	28	2	1	0	0	0	0	0	677
25.09.2009	2	3,75	40,3	2	3	76	32	2	1	0	0	0	0	0	684

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Epi-skleral-gefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
26.09.2009	2	3,75	40,9	3	3	80	20	2	1	0	0	0	0	0	686
27.09.2009	2	3,75	40,8	3	4	76	28	1	1	0	0	0	0	0	688
28.09.2009	2	3,75	40,1	3	3	96	24	1	1	0	0	0	0	0	692
29.09.2009	2	3,75	39,1	3	4	84	36	2	1	0	0	0	0	0	705
30.09.2009	2	3,75	38,7	3	5	84	36	2	1	0	0	0	0	0	707
01.10.2009	2	3,75	38,9	3	3	80	28	3	1	1	0	0	0	0	716
02.10.2009	2	3,75	38,9	3	3	84	32	3	1	1	0	0	0	0	722
03.10.2009	1	3,75	38,8	3	3	88	36	3	1	1	0	0	0	0	724
04.10.2009	1	3,75	38,1	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	726
05.10.2009	1	3,75	38,9	2	2	84	40	3	1	0	0	0	0	0	736
06.10.2009	1	3,75	38,3	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	744
07.10.2009	1	3,75	38,5	2	2	84	60	3	1	0	0	0	0	0	748
08.10.2009	1	3,75	38,5	2	2	88	50	3	1	0	0	0	0	0	757
09.10.2009	1	3,75	38,6	2	2	92	40	3	1	0	0	0	0	0	763
10.10.2009	1	3,75	38,5	2	2	84	32	3	1	0	0	0	0	0	765
11.10.2009	1	3,75	39,1	2	2	84	36	3	1	0	0	0	0	0	766
12.10.2009	1	3,75	38,5	2	1	76	32	3	1	0	0	0	0	0	778
13.10.2009	1	3,75	38,3	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	782
14.10.2009	1	3,75	38,4	2	1	88	28	3	1	0	0	0	0	0	
15.10.2009	1	3,75	38,3	2	2	88	32	3	1	0	0	0	0	0	795
16.10.2009	1	3,75	38,4	2	1	88	28	3	1	0	0	0	0	0	
17.10.2009	1	3,75	38,5	2	1	72	32	3	1	0	0	0	0	0	
18.10.2009	1	3,75	39,2	2	1	92	24	3	1	0	0	0	0	0	
19.10.2009	1	3,75	38,7	2	2	84	32	3	1	0	0	0	0	0	807
20.10.2009	1	3,75	38,6	2	2	92	24	3	1	0	0	0	0	2	
21.10.2009	1	3,75	38,6	2	1	84	32	2	1	0	0	0	0	1	
22.10.2009	1	3,75	38,5	2	1	84	28	3	1	0	0	0	0	1	826
23.10.2009	1	3,75	38,5	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	2	
24.10.2009	1	3,75	38,6	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	2	
25.10.2009	1	3,75	38,3	2	1	68	28	3	1	0	0	0	0	2	
26.10.2009	1	3,75	38,5	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	2	840
27.10.2009	1	3,75	38,4	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	2	
28.10.2009	1	3,75	38,4	2	1	92	36	3	1	0	0	0	0	2	
29.10.2009	1	3,75	38,5	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	2	856
30.10.2009	1	3,75	38,6	2	2	72	28	3	1	0	0	0	0	2	
31.10.2009	1	3,75	38,9	2	1	76	28	3	1	0	0	0	0	2	
01.11.2009	1	3,75	38,6	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	2	
02.11.2009	1	3,75	38,4	2	2	88	32	3	1	0	0	0	0	2	867
03.11.2009	1	3,75	38,4	2	1	72	28	3	1	0	0	0	0	2	
04.11.2009	1	3,75	38,4	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	2	
05.11.2009	1	3,75	38,7	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	2	881
06.11.2009	1	3,75	38,5	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	2	
07.11.2009	1	3,75	38,3	2	1	84	28	3	1	0	0	0	0	2	
08.11.2009	1	3,75	38,3	2	2	84	24	3	1	0	0	0	0	2	
09.11.2009	1	4	38,8	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	2	906
16.11.2009	1	4,25	39,2	2	1	96	44	3	1	0	0	0	0	2	
30.11.2009	1	4,5	38,9	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	2	
15.12.2009	1	4,75	38,6	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	2	1063
29.12.2009	1	4,5	38,2	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	2	
13.01.2010	1	4,5	38,6	2	1	68	32	3	1	0	0	0	1	2	
03.02.2010	1	4	39,1	2	2	96	36	3	1	0	0	0	0	2	
17.02.2010	1	4,25	38,0	2	1	88	28	3	1	0	0	0	0	1	
04.03.2010	1	4,25	38,2	2	1	80	24	3	1	0	0	0	0	1	
18.03.2010	1	4,5	38,4	2	1	68	20	3	1	0	0	0	1	1	1097
30.03.2010	1	4,5	37,8	2	1	84	24	3	1	0	0	0	1	1	

Tabelle IX-2: VT4, Ergebnisse der Serologie und PCR: Blots (Anzahl der Banden), IFAT-Titer (Verdünnungsstufe), PCR (N/A = negatives Ergebnis).

Datum	Lfd. Nr.	Bradyzoiten-Blot	Tachyzoiten-Blot	IFAT-Titer	Haut PCR Ct-Werte
07.09.2009	607				N/A
14.09.2009	635				N/A
21.09.2009	667	0	1	0	N/A
23.09.2009	669	0	0	0	38,69
24.09.2009	677	0	0	0	34,49
25.09.2009	684	0	0	0	
26.09.2009	686	1	0	0	32,20
27.09.2009	688	1	1	50	
28.09.2009	692	2	1	100	32,55
29.09.2009	705	2	1	200	
30.09.2009	707	3	1	400	32,51
02.10.2009	722				36,68
04.10.2009	726	6	4	400	33,97
06.10.2009	744	4	4	1600	34,68
08.10.2009	757				N/A
09.10.2009	763	4	5	800	
10.10.2009	765				34,90
11.10.2009	766				
12.10.2009	778	4	5	1600	34,52
13.10.2009	782				
19.10.2009	807				33,03
26.10.2009	840	7	8	1600	N/A
02.11.2009	867				34,43
09.11.2009	906	7	8	3200	N/A
15.12.2009	1063	9	9	3200	N/A
18.03.2009	1097	10	10	1600	N/A

Tabelle IX-3: VT4, Histologische Befunde: Ödem/Tachyzoiten-Nachweis/Zysten-Nachweis (+ = positiver Nachweis; - = nicht nachgewiesen), Zellinfiltrationen (+ = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig).

E-Nummer	Lfd. Nr.	Entnahme-Datum	Tag	dermales Ödem	Tachyzoiten-Nachweis	Zysten-Nachweis	Zellinfiltrationen	perizystische Zellinfiltrationen
E1754/09	465	06.08.2009		-	-	-	+	-
E1782/09	478	10.08.2009		-	-	-	+	-
E1841/09	497	13.08.2009		-	-	-	+	-
E1875/09	509	17.08.2009		-	-	-	+	-
E1917/09	525	20.08.2009		-	-	-	+	-
E1959/09	543	24.08.2009		-	-	-	+	-
E2011/09	576	31.08.2009		-	-	-	+	-
E2100/09	607	07.09.2009		-	-	-	+	-
E2147/09	635	14.09.2009		-	-	-	+	-
E2242/09	667	21.09.2009		-	-	-	+	-
E2279/09	669	23.09.2009	1	-	+	-	+	-
E2305/09	677	24.09.2009	2	+	+	-	+ - ++	-
E2330/09	686	26.09.2009	4	+	+	-	++ - +++	-
E2320/09	692	28.09.2009	6	+	+	-	++ - +++	-
E2363/09	707	30.09.2009	8	+	+	-	+++	-
E2377/09	722	02.10.2009	10	+	+	+	++ - +++	-
E2379/09	726	04.10.2009	12	+	+	+	+++	-
E2434/09	744	06.10.2009	14	+	-	+	+ - ++	-
E2437/09	757	08.10.2009	16	+	-	+	+	-
E2451/09	765	10.10.2009	18	+	-	+	+ - ++	-
E2455/09	778	12.10.2009	20	-	-	+	+	-
E2546/09	795	15.10.2009	23	-	-	+	+	+++
E2555/09	807	19.10.2009	27	-	-	+	+	+++
E2588/09	826	22.10.2009	30	-	-	+	+	+++
E2617/09	840	26.10.2009	34	-	-	+	+	+++
E2690/09	856	29.10.2009	37	-	-	-	+	-
E2694/09	867	02.11.2009	41	-	-	+	+	+++
E2738/09	881	05.11.2009	44	-	-	+	+	+++
E2783/09	906	09.11.2009	48	-	-	-	+	-
E3114/09	1063	15.12.2009	84	-	-	-	+	-
E675/10	1097	18.03.2010	177	-	-	-	+ - ++	-

Tabelle IX-4: VT6, Befunde der klinischen Untersuchungen: Verhalten (1 = aufmerksam; 2 = niedergeschlagen), BCS (nach Edmonson *et al.* 1989), Schleimhäute (1 = blass; 2 = blassrosa; 3 = rosa), Episkleralgefäße (1 = fein gezeichnet; 2 = mäßig gezeichnet; 3 = gut gezeichnet; 4 = injiziert; 5 = injiziert/verwaschen), Pansenfüllung (1=schlecht gefüllt; 2 = mäßig gefüllt; 3=gut gefüllt), Gangbild (nach Sprecher *et al.* 1997), Lymphknoten (0 = keine Veränderung; 1 = vergrößert und palpatorisch verändert), Haut/Unterhautödeme (0 = keine Veränderungen), Zysten (0 = keine Zysten; 1 = 1-5 Stück; 2 = 6-10 Stück).

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Episkleralgefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
06.08.2009	1		38,4	2	2	84	40	3	1	0	0	0	0	0	471
07.08.2009	1		38,2	2	2	96	40	3	1						
08.08.2009	1		38,5	2	1	84	36	3	1						
09.08.2009	1		38,5	2	1	72	32	3	1						
10.08.2009	1	4,00	38,5	2	2	68	40	3	1	0	0	0	0	0	485
11.08.2009	1		38,4	2	2	64	32	3	1						
12.08.2009	1		38,6	2	2	64	32	3	1						
13.08.2009	1	3,75	38,6	2	2	88	36	2	4	0	0	0	0	0	496
14.08.2009	1		37,7	2	1	96	36	2	3						
15.08.2009	1		38,5	2	2	100	32	3	1						
16.08.2009	1		38,4	2	2	72	32	3	1						
17.08.2009	1	3,75	38,5	2	2	80	36	2	1	0	0	0	0	0	504
18.08.2009	1		38,4	2	2	76	32	3	1						
19.08.2009	1		39,1	2	3	72	44	3	1						
20.08.2009	1	3,75	38,3	2	2	76	36	3	1	0	0	0	0	0	524
21.08.2009	1		38,4	2	2	84	40	3	1						
22.08.2009	1		38,7	2	2	80	24	3	1						
23.08.2009	1		39,6	2	2	76	28	2	1						
24.08.2009	1	3,75	38,5	2	2	68	36	3	1	0	0	0	0	0	542
25.08.2009	1		38,3	2	2	80	36	2	1						
26.08.2009	1		38,2	2	1	68	36	3	1						
27.08.2009	1	3,75	38,7	2	1	84	48	2	1	0	0	0	0	0	560
28.08.2009	1		38,4	2	2	76	40	3	1						
29.08.2009	1		38,6	2	2	76	28	3	1						
30.08.2009	1		38,5	2	2	76	32	3	1						
31.08.2009	1	3,75	38,3	2	2	68	32	3	1	0	0	0	0	0	579
01.09.2009	1		38,7	2	2	64	28	3	1						
02.09.2009	1		38,2	2	3	76	28	3	1						
03.09.2009	1	3,75	38,2	2	3	76	32	3	1	0	0	0	0	0	594
04.09.2009	1		38,2	2	2	84	32	3	1						
05.09.2009	1		38,3	2	2	88	36	3	1						
06.09.2009	1		38,1	2	2	76	28	3	1						
07.09.2009	1	3,75	38,0	2	2	84	32	3	1	0	0	0	0	0	605
08.09.2009	1		38,4	2	2	72	28	3	1						
09.09.2009	1		38,2	2	2	84	28	3	1						
10.09.2009	1	3,75	38,5	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	0	622
11.09.2009	2		38,2	2	2	80	36	3	1						
12.09.2009	1		38,4	2	2	92	32	3	1						
13.09.2009	1	3,75	38,6	2	2	80	28	3	1						
14.09.2009	1	4,00	39,0	2	2	88	32	3	1	0	0	0	0	0	633
15.09.2009	1	4,00	39,9	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	638
16.09.2009	1		39,3		5			3	1						
17.09.2009	1	4,00	39,3	2	5	84	28	3	1	0	0	0	0	0	649
18.09.2009	2	4,00	40,3	2	5	84	28	3	1	1	0	0	0	0	652
19.09.2009	2	4,00	39,9	2	5	92	28	2	1	1	0	0	0	0	653
20.09.2009	2	4,00	39,6	2	5	84	24	2	1	1	0	0	0	0	654
21.09.2009	2	4,00	39,7	2	5	80	32	2	1	0	0	0	0	0	666
22.09.2009	2	4,00	38,6	2	5	76	28	2	1	0	0	0	0	0	668
23.09.2009	1	4,00	38,5	2	5	88	28	3	1	0	0	0	0	0	670
24.09.2009	2	4,00	38,4	2	5	76	32	3	1	0	0	0	0	0	676
25.09.2009	2	4,00	38,5	2	4	68	28	2	1	1	0	0	0	0	685
26.09.2009	2	4,00	38,5	2	3	76	20	2	1	0	0	0	0	0	687
27.09.2009	2	4,00	38,4	2	3	68	28	2	1	0	0	0	0	0	689
28.09.2009	1	4,00	38,4	2	3	88	28	3	1	0	0	0	0	0	693
29.09.2009	1	4,00	38,4	2	2	76	32	3	1	0	0	0	0	0	704
30.09.2009	1	4,00	38,3	2	3	84	32	3	1	0	0	0	0	0	706
01.10.2009	1	4,00	38,6	2	3	88	32	3	1	0	0	0	0	1	715
02.10.2009	1	4,00	38,4	2	3	88	32	3	1	0	0	0	0	0	721
03.10.2009	1	4,00	38,3	2	3	80	32	3	1	0	0	0	0	0	725
04.10.2009	1	4,00	38,5	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	0	727
05.10.2009	1	4,00	38,5	2	2	88	28	3	1	0	0	0	0	1	739
06.10.2009	1	4,00	38,3	2	3	84	32	3	1	0	0	0	0	1	743
07.10.2009	1	4,00	38,3	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	747

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Epi-skleral-gefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
08.10.2009	1	4,00	38,4	2	2	88	36	3	1	0	0	0	0	0	758
09.10.2009	1	4,00	38,6	2	2	84	36	3	1	0	0	0	0	0	
10.10.2009	1	4,00	38,7	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	0	
11.10.2009	1	4,00	38,5	2	2	92	40	3	1	0	0	0	0	0	
12.10.2009	1	4,00	38,2	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	779
13.10.2009	1	4,00	38,3	2	2	88	32	3	1	0	0	0	0	0	
14.10.2009	1	4,00	38,4	2	1	88	32	3	1	0	0	0	0	0	
15.10.2009	1	4,00	38,2	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	0	794
16.10.2009	1	4,00	38,6	2	1	80	24	3	1	0	0	0	0	0	
17.10.2009	1	4,00	38,8	2	1	84	28	3	1	0	0	0	0	0	
18.10.2009	1	4,00	38,7	2	2	84	32	3	1	0	0	0	0	0	
19.10.2009	1	4,00	38,6	2	2	84	32	3	1	0	0	0	0	0	809
20.10.2009	1	4,00	38,5	2	2	90	28	3	1	0	0	0	0	0	
21.10.2009	1	4,00	38,4	2	1	72	24	3	1	0	0	0	0	0	
22.10.2009	1	4,00	38,5	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	0	827
23.10.2009	1	4,00	38,3	2	2	72	28	3	1	0	0	0	0	1	
24.10.2009	1	4,00	38,6	2	2	76	32	3	1	0	0	0	0	1	
25.10.2009	1	4,00	38,1	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	2	
26.10.2009	1	4,00	38,4	2	1	76	28	3	1	0	0	0	0	2	839
27.10.2009	1	4,00	38,7	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	2	
28.10.2009	1	4,00	38,6	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	1	
29.10.2009	1	4,00	38,8	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	2	851
30.10.2009	1	4,00	38,5	2	1	88	24	3	1	0	0	0	0	2	
31.10.2009	1	4,00	38,9	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	1	
01.11.2009	1	4,00	38,0	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	2	
02.11.2009	1	4,00	38,8	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	2	866
03.11.2009	1	4,00	38,4	2	1	76	28	3	1	0	0	0	0	2	
04.11.2009	1	4,00	38,5	2	1	84	24	3	1	0	0	0	0	2	
05.11.2009	1	4,00	38,6	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	2	882
06.11.2009	1	4,00	38,1	2	2	84	28	3	1	0	0	0	0	2	
07.11.2009	1	4,00	38,4	2	1	72	24	3	1	0	0	0	0	2	
08.11.2009	1	4,00	38,7	2	1	72	24	3	1	0	0	0	0	2	
09.11.2009	1	4,00	38,6	2	1	72	24	3	1	0	0	0	0	2	903
16.11.2009	1,0	4,50	39,2	2	1	72	32	3	1	0	0	0	0	2	
30.11.2009	1,0	4,75	39,1	2	2	84	32	3	1	0	0	0	0	2	
15.12.2009	1,0	4,75	38,6	2	1	72	28	3	1	0	0	0	0	2	1060
29.12.2009	1,0	4,50	38,5	2	1	80	32	3	1	0	0	0	0	2	
13.01.2010	1,0	4,50	38,0	2	2	72	36	3	1	0	0	0	0	2	
03.02.2010	1,0	4,50	39,1	2	2	92	36	3	1	0	0	0	1	1	
17.02.2010	1,0	4,50	38,6	2	2	80	24	3	1	0	0	0	2	1	
04.03.2010	1,0	4,50	38,4	2	2	80	24	3	1	0	0	0	2	2	
18.03.2010	1,0	4,50	38,5	2	1	80	28	3	1	0	0	0	1	2	1096
30.03.2010	1,0	4,50	38,5	2	1	80	28	3	1	0	0	0	1	2	

Tabelle IX-5: VT6, Ergebnisse der Serologie und PCR: Blots (Anzahl der Banden), IFAT-Titer (Verdünnungsstufe), PCR (N/A = negatives Ergebnis).

Datum	Lfd. Nr.	Bradyzoiten-Blot	Tachyzoiten-Blot	IFAT-Titer	Haut PCR Ct-Werte
31.08.2009	579				N/A
07.09.2009	605				N/A
14.09.2009	633				N/A
15.09.2009	638	0	0	0	N/A
17.09.2009	649	0	0	0	
18.09.2009	652	0	0	50	34,98
19.09.2009	653	0	1	50	33,83
20.09.2009	654	3	2	100	30,42
21.09.2009	666	6	4	200	32,98
22.09.2009	668				33,76
23.09.2009	670				35,96
24.09.2009	676	4	1	400	34,68
26.09.2009	687	4	4	400	35,05
28.09.2009	693	4	5	400	
30.09.2009	706	6	5	800	35,28
04.10.2009	727	6	5	800	33,56
19.10.2009	809	5	8	1600	32,86
02.11.2009	866	6	7	1600	26,02
09.11.2009	903	8	8	3200	23,23
15.12.2009	1060	10	7	1600	N/A
18.03.2009	1096	10	7	3200	N/A

Tabelle IX-6: VT6, Histologische Befunde: Ödem/Tachyzoiten-Nachweis/Zysten-Nachweis (+ = positiver Nachweis; - = nicht nachgewiesen), Zellinfiltrationen (+ = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig).

E-Nummer	Lfd. Nr.	Entnahme-Datum	Tag	dermales Ödem	Tachyzoiten-Nachweis	Zysten-Nachweis	Zellinfiltrationen	perizystische Zellinfiltrationen
E1760/09	471	06.08.2009		-	-	-	+	-
E1789/09	485	10.08.2009		-	-	-	+	-
E1840/09	496	13.08.2009		-	-	-	+	-
E1870/09	504	17.08.2009		-	-	-	+	-
E1916/09	524	20.08.2009		-	-	-	+	-
E1961/09	542	24.08.2009		-	-	-	+	-
E2013/09	579	31.08.2009		-	-	-	+	-
E2098/09	605	07.09.2009		-	-	-	+	-
E2149/09	633	14.09.2009		-	-	-	+	-
E2162/09	638	15.09.2009		-	-	-	+	-
E2234/09	652	18.09.2009	1	-	+	-	+	-
E2235/09	653	19.09.2009	2	+	+	-	+ - ++	-
E2236/09	654	20.09.2009	3	+	+	-	++	-
E2244/09	666	21.09.2009	4	+	+	-	++ - +++	-
E2263/09	668	22.09.2009	5	+	+	-	++ - +++	-
E2280/09	670	23.09.2009	6	+	+	-	++ - +++	-
E2304/09	676	24.09.2009	7	+	+	-	++	-
E2331/09	687	26.09.2009	9	+	-	+	++	-
E2322/09	693	28.09.2009	11	+	-	+	++ - +++	-
E2362/09	706	30.09.2009	13	+	-	+	+	-
E2378/09	721	02.10.2009	15	+	-	+	+	-
E2380/09	727	04.10.2009	17	-	-	-	+	-
E2433/09	743	06.10.2009	19	-	-	+	+	-
E2438/09	758	08.10.2009	21	-	-	+	+	-
E2457/09	779	12.10.2009	25	-	-	+	+	-
E2547/09	794	15.10.2009	28	-	-	+	+	-
E2557/09	809	19.10.2009	32	-	-	+	+	-
E2589/09	827	22.10.2009	35	-	-	+	+	-
E2619/09	839	26.10.2009	39	-	-	+	+	+
E2689/09	851	29.10.2009	42	-	-	+	+	+ - ++
E2696/09	866	02.11.2009	46	-	-	+	+	+ - ++
E2740/09	882	05.11.2009	49	-	-	+	+	+ - ++
E2784/09	903	09.11.2009	53	-	-	+	+	++ - +++
E3115/09	1060	15.12.2009	89	-	-	+	+ - ++	++ - +++
E674/10	1096	18.03.2010	182	-	-	-	+	-

Tabelle IX-7: VT8, Befunde der klinischen Untersuchungen: Verhalten (1 = aufmerksam; 2 = niedergeschlagen), BCS (nach Edmonson *et al.* 1989), Schleimhäute (1 = blass; 2 = blassrosa; 3 = rosa), Episkleralgefäße (1 = fein gezeichnet; 2 = mäßig gezeichnet; 3 = gut gezeichnet), Pansenfüllung (1 = schlecht gefüllt; 2 = mäßig gefüllt; 3 = gut gefüllt), Gangbild (nach Sprecher *et al.* 1997), Lymphknoten (0 = keine Veränderung), Haut/Unterhautödeme (0 = keine Veränderungen), Zysten (0 = keine Zysten).

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Episkleralgefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
06.08.2009	1,0		38,7	2	1	96	44	3	1	0	0	0	0	0	463
07.08.2009	1,0		38,5	2	2	92	40	3	1						
08.08.2009	1,0		38,4	2	1	72	32	3	1						
09.08.2009	1,0		38,5	2	2	76	32	3	1						
10.08.2009	1,0	3,5	38,5	2	2	80	28	3	1	0	0	0	0	0	474
11.08.2009	1,0		38,2	2	1	76	36	3	1						
12.08.2009	1,0		38,6	2	2	68	28	3	1						
13.08.2009	1,0	3,5	38,6	2	1	80	40	3	1	0	0	0	0	0	491
14.08.2009	1,0		38,5	2	1	92	32	3	1						
15.08.2009	1,0		38,3	2	1	92	40	3	1						
16.08.2009	1,0		38,0	2	1	84	36	3	1						
17.08.2009	1,0	3,75	38,7	2	1	72	28	3	1	0	0	0	0	0	502
18.08.2009	1,0		38,7	2	1	84	32	3	1						
19.08.2009	1,0		38,7	2	1	76	36	2	2						
20.08.2009	1,0	3,5	38,1	2	2	76	40	3	1	0	0	0	0	0	523
21.08.2009	1,0		39,0	2	1	88	40	3	1						
22.08.2009	1,0		39,0	2	1	80	32	3	1						
23.08.2009	1,0		38,4	2	2	100	28	3	1						
24.08.2009	1,0	3,5	38,5	2	2	76	36	2	2	0	0	0	0	0	540
25.08.2009	1,0		38,1	2	2	92	36	3	1						
26.08.2009	1,0		38,2	2	2	92	32	2	1						
27.08.2009	1,0	3,25	38,5	2	1	92	32	3	1	0	0	0	0	0	556
28.08.2009	1,0		38,2	2	2	84	28	3	1						
29.08.2009	1,0		38,6	2	2	88	36	2	1						
30.08.2009	1,0		38,4	2	1	72	24	3	1						
31.08.2009	1,0	3,5	38,5	2	1	72	36	2	1	0	0	0	0	0	577
01.09.2009	1,0		38,3	2	3	88	28	2	1						
02.09.2009	1,0		38,3	2	2	80	36	2	1						
03.09.2009	1,0	3,5	38,1	2	3	76	28	3	1	0	0	0	0	0	593
04.09.2009	1,0		38,5	2	2	92	36	2	1						
05.09.2009	1,0		38,2	2	1	76	24	3	1						
06.09.2009	1,0		38,5	2	2	76	28	3	1						
07.09.2009	1,0	3,5	38,2	2	1	88	32	3	1	0	0	0	0	0	604
08.09.2009	1,0		38,6	2	2	72	28	3	1						
09.09.2009	1,0		38,3	2	2	76	36	2	1						
10.09.2009	1,0	3,5	38,6	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	0	619
11.09.2009	1,0		38,2	2	2	80	32	3	1						
12.09.2009	1,0		38,6	2	2	96	32	3	1						
13.09.2009	1,0	3,5	38,7	2	3	76	24	3	1						
14.09.2009	1,0	3,75	38,9	2	2	76	32	3	1	0	0	0	0	0	634
15.09.2009	1,0		38,5		1				1						
16.09.2009	1,0		38,5		2			3	1						
17.09.2009	1,0	3,75	38,3	2	2	76	32	3	1	0	0	0	0	0	650
18.09.2009	1,0		38,6		1				1						
19.09.2009	1,0		38,5		1				1						
20.09.2009	1,0		38,5		2				1						
21.09.2009	1,0	3,75	38,4	2	1	80	28	3	1	0	0	0	0	0	665
22.09.2009	1,0		38,2		2				1						
23.09.2009	1,0		38,6		1				1						
24.09.2009	1,0	3,75	38,5	2	1	84	32	3	1	0	0	0	0	0	673
25.09.2009	1,0		38,5		2				1						
26.09.2009	1,0		38,3	2	2	72	28	3	1						
27.09.2009	1,0		38,3		2				1						
28.09.2009	1,0	3,75	38,2	2	1	68	28	3	1	0	0	0	0	0	695
29.09.2009	1,0		38,3		2				1						
30.09.2009	1,0		38,3		2				1						
01.10.2009	1,0	3,75	39,1	2	1	76	28	3	1	0	0	0	0	0	717
02.10.2009	1,0		38,0		1				1						
03.10.2009	1,0		38,2		2				1						
04.10.2009	1,0		38,3		2				1						
05.10.2009	1,0	3,75	38,5	2	2	92	40	3	1	0	0	0	0	0	734
06.10.2009	1,0		38,2		1				1						
07.10.2009	1,0		38,7		1				1						
08.10.2009	1,0	3,75	38,6	2	1	84	28	3	1	0	0	0	0	0	759

Datum	Ver- hal- ten	BCS	Temp. °C	Schleim- häute	Epi- skleral- gefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansen- füllung	Gangbild Grad 1-5	Lymph- knoten	Haut	Ödeme in der Unter- haut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
09.10.2009	1,0		38,5		2				1						
10.10.2009	1,0		38,8		2				1						
11.10.2009	1,0		38,3		2				1						
12.10.2009	1,0	3,75	39,2	2	1	88	28	3	1	0	0	0	0	0	775
13.10.2009	1,0		38,5		1				1						
14.10.2009	1,0		38,3		2				1						
15.10.2009	1,0	3,75	38,3	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	0	793
16.10.2009	1,0		37,9		1				1						
17.10.2009	1,0		38,3		1				1						
18.10.2009	1,0		38,4		1				1						
19.10.2009	1,0	3,75	38,6	2	2	68	32	3	1	0	0	0	0	0	808
20.10.2009	1,0		38,2		1				1						
21.10.2009	1,0		38,6		1				1						
22.10.2009	1,0	3,75	38,4	2	1	76	28	3	1	0	0	0	0	0	829
23.10.2009	1,0		38,9		1				1						
24.10.2009	1,0		38,9		2				1						
25.10.2009	1,0		38,9		1				1						
26.10.2009	1,0	3,75	38,7	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	0	842
27.10.2009	1,0		38,2		2				1						
28.10.2009	1,0		38,4		2				1						
29.10.2009	1,0	3,75	38,7	2	2	88	32	3	1	0	0	0	0	0	853
30.10.2009	1,0		38,4		2				1						
31.10.2009	1,0		38,8		1				1						
01.11.2009	1,0		38,7		1				1						
02.11.2009	1,0	3,75	38,8	2	1	80	36	3	1	0	0	0	0	0	868
03.11.2009	1,0		38,2	2	2				1				0	0	871
04.11.2009	1,0		38,6		3				1						874
05.11.2009	1,0	3,75	38,7	2	2	76	24	3	1	0	0	0	0	0	884
06.11.2009	1,0		38,5		1				1						890
07.11.2009	1,0		38,4	2	1			3	1	0	0	0	0	0	892
08.11.2009	1,0		38,7	2	2			3	1	0	0	0	0	0	894
09.11.2009	1,0	3,75	38,8	2	1	72	28	3	1	0	0	0	0	0	905
16.11.2009	1,0	4	39,1	2	1	92	44	3	1	0	0	0	0	0	
30.11.2009	1,0	4	38,9	2	2	76	28	3	1	0	0	0	0	0	
15.12.2009	1,0	4	38,8	2	1	80	32	3	1	0	0	0	0	0	1062
29.12.2009	1,0	3,75	38,5	2	1	80	36	3	1	0	0	0	0	0	1068
13.01.2010	1,0	3,75	37,9	2	2	68	36	3	1	0	0	0	0	0	
03.02.2010	1,0	3,75	39,0	2	1	92	32	3	1	0	0	0	0	0	
17.02.2010	1,0	4	37,8	2	1	84	24	4	1	0	0	0	0	0	
04.03.2010	1,0	4	38,0	2	1	72	28	3	1	0	0	0	0	0	
18.03.2010	1,0	4,25	38,3	2	1	76	24	3	1	0	0	0	0	0	1094
30.03.2010	1,0	4	38,0	2	1	80	32	3	1	0	0	0	0	0	

Tabelle IX-8: VT8, Ergebnisse der Serologie und PCR: Blots (Anzahl der Banden), IFAT-Titer (Verdünnungsstufe), PCR (N/A = negatives Ergebnis).

Datum	Lfd. Nr.	Bradyzoiten-Blot	Tachyzoiten-Blot	IFAT-Titer	Haut PCR Ct-Werte
12.10.2009	775	0	0		N/A
15.10.2009	793	0	0		
19.10.2009	808	0	0		N/A
22.10.2009	829	0	0		
26.10.2009	842	1	1	50	39,08
29.10.2009	853	6	4	800	
02.11.2009	868	6	4	800	N/A
03.11.2009	871	8	5	400	
05.11.2009	884	5	4	800	N/A
07.11.2009	892				N/A
09.11.2009	905	4	4	800	N/A
15.12.2009	1062	7	6	1600	
29.12.2009	1068				27,42
18.03.2009	1094	9	6	800	N/A

Tabelle IX-9: VT8, Histologische Befunde: Ödem/Tachyzoiten-Nachweis/Zysten-Nachweis (+ = positiver Nachweis; - = nicht nachgewiesen), Zellinfiltrationen (+ = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig).

E-Nummer	Lfd. Nr.	Entnahme-Datum	Tag	dermales Ödem	Tachyzoiten-Nachweis	Zysten-Nachweis	Zellinfiltrationen	perizystische Zellinfiltrationen
E1752/09	463	06.08.2009	-	-	-	-	+	-
E1778/09	474	10.08.2009	-	-	-	-	+	-
E1835/09	491	13.08.2009	-	-	-	-	+	-
E1868/09	502	17.08.2009	-	-	-	-	+	-
E1914/09	523	20.08.2009	-	-	-	-	+	-
E1963/09	540	24.08.2009	-	-	-	-	+	-
E2015/09	577	31.08.2009	-	-	-	-	+	-
E2097/09	604	07.09.2009	-	-	-	-	+	-
E2151/09	634	14.09.2009	-	-	-	-	+	-
E2246/09	665	21.09.2009	-	-	-	-	+	-
E2324/09	695	28.09.2009	-	-	-	-	+	-
E2389/09	734	05.10.2009	-	-	-	-	+	-
E2459/09	775	12.10.2009	-	-	-	-	+	-
E2559/09	808	19.10.2009	-	-	-	-	+	-
E2621/09	842	26.10.2009	-	-	-	-	+	-
E2698/09	868	02.11.2009	-	-	-	-	+++	-
E2742/09	884	05.11.2009	-	-	-	-	+	-
E2761/09	892	07.11.2009	-	-	-	-	+	-
E2785/09	905	09.11.2009	-	-	-	-	+	-
E14/10	1068	29.12.2009	-	-	-	-	+	-
E672/10	1094	18.03.2010	-	-	-	-	+	-

Tabelle IX-10: VT20, Befunde der klinischen Untersuchungen: Verhalten (1 = aufmerksam; 2 = niedergeschlagen), BCS (nach Edmonson *et al.* 1989), Schleimhäute (1 = blass; 2 = blassrosa; 3 = rosa), Episkleralgefäße (1 = fein gezeichnet; 2 = mäßig gezeichnet; 3 = gut gezeichnet; 4 = injiziert; 5 = injiziert/verwaschen), Pansenfüllung (1 = schlecht gefüllt; 2 = mäßig gefüllt; 3 = gut gefüllt), Gangbild (nach Sprecher *et al.* 1997), Lymphknoten (0 = keine Veränderung; 1 = vergrößert und palpatorisch verändert; 2 = stark vergrößert und palpatorisch verändert), Haut (0 = keine Veränderungen; 1 = geringgradige Veränderungen/Verdickung; 2 = mittelgradige Veränderungen/Verdickungen; 3 = hochgradige Veränderungen/Verdickungen), Ödeme (0 = keine Veränderungen; 1 = geringgradige Ödeme), Zysten (0 = keine Zysten; 1 = 1-5 Stück; 2 = 6-10 Stück; 3 = 11-20 Stück; 4 = 21-30 Stück; 5 = >30 Stück).

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Episkleralgefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
20.08.2009			40,7	3	1	108	120	2	3	0	0	0	0	0	528
21.08.2009	1,0		38,2	2	3	76	72	2	3	0	0	0	0	0	530
22.08.2009	1,0	3,00	38,6	2	5	84	28	2	2	0	0	1	0	0	531
23.08.2009	1,0	3,00	38,5	2	5	108	44	2	2	0	0	1	0	0	532
24.08.2009	1,0	3,00	38,8	2	4	88	40	2	1	0	0	1	0	0	544
25.08.2009	1,0	3,00	38,3	2	3	88	60	3	1	0	0	1	0	0	546
26.08.2009	1,0	3,00	38,3	2	3	80	28	2	1	0	0	0	0	0	547
27.08.2009	1,0	3,00	38,5	2	3	80	44	3	1	0	0	0	0	0	557
28.08.2009	1,0	3,00	38,2	2	2	88	40	2	1	0	0	0	0	0	561
29.08.2009	1,0	3,00	38,1	2	2	76	32	3	1	0	0	0	0	0	562
30.08.2009	1,0	3,00	38,4	2	3	80	28	3	1	0	0	0	0	0	566
31.08.2009	1,0	3,00	38,8	2	2	80	32	3	1	0	0	0	0	0	575
01.09.2009	1,0	3,00	38,2	2	2	92	36	3	1	0	0	0	0	0	580
02.09.2009	1,0	3,00	38,1	2	2	84	44	3	1	0	0	0	0	0	581
03.09.2009	1,0	3,00	38,3	2	3	88	44	3	1	0	0	0	0	0	589
04.09.2009	1,0	3,00	38,1	2	2	76	40	3	1	0	0	0	0	0	595
05.09.2009	1,0	2,75	37,6	2	1	72	28	3	1	1	0	0	0	0	596
06.09.2009	1,0	2,75	38,0	2	2	72	36	3	1	2	0	0	0	0	597
07.09.2009	1,0	2,75	37,8	2	2	72	32	3	1	2	0	0	0	0	610
08.09.2009	1,0	2,75	38,2	2	1	80	36	3	1	2	0	0	0	0	611
09.09.2009	1,0	2,75	38,5	2	2	80	32	3	1	2	0	0	0	0	
10.09.2009	1,0	2,75	38,4	2	2	80	32	3	1	2	0	0	0	0	621
11.09.2009	1,0	2,75	38,2	2	2	76	32	3	1	2	0	0	0	0	
12.09.2009	1,0	2,75	38,0	2	2	68	28	3	1	2	1	0	0	1	
13.09.2009	1,0	2,75	38,3	2		76	32	3	1	2	1	0	0	5	
14.09.2009	1,0	2,75	38,1	2	2	88	28	3	1	1	1	0	0	1	631
15.09.2009	1,0	2,75	38,2	2	2	76	24	3	1	0	1	0	0	5	
16.09.2009	1,0	2,75	40,1	2	2	76	28	3	1	1	1	0	3	3	
17.09.2009	1,0	2,75	38,0	2	2	84	32	3	1	0	1	0	3	5	645
18.09.2009	1,0	2,75	38,1	2	2	80	36	3	1	0	1	0	2	5	
19.09.2009	1,0	2,75	38,0	2	2	76	28	3	1	0	1	0	2	5	
20.09.2009	1,0	2,75	38,4	2	2	72	32	3	1	0	1	0	3	5	
21.09.2009	1,0	2,75	38,6	2	2	80	28	3	1	0	1	0	3	5	664
22.09.2009	1,0	2,75	38,5	2	3	68	28	3	1	0	1	0	3	5	
23.09.2009	1,0	2,75	38,0	2	2	68	28	3	1	0	2	0	3	4	
24.09.2009	1,0	2,75	38,5	2	3	76	28	3	1	0	2	0	3	5	671
25.09.2009	1,0	2,75	38,0	2	2	72	28	3	1	0	2	0	3	5	
26.09.2009	1,0	2,50	37,9	2	2	68	20	3	1	0	3	0	5	5	
27.09.2009	1,0	2,50	38,5	2	2	72	28	3	1	0	3	0	5	5	
28.09.2009	1,0	2,50	38,1	2	2	88	32	3	1	0	3	0	5	5	703
29.09.2009	1,0	2,50	38,0	2	2	84	28	3	1	0	3	0	5	5	
30.09.2009	1,0	2,50	37,9	2	2	68	28	3	1	0	3	0	5	5	
01.10.2009	1,0	2,50	38,2	2	2	92	36	3	1	0	3	0	5	5	720
02.10.2009	1,0	2,50	38,2	2	1	92	28	3	1	0	3	0	5	5	
03.10.2009	1,0	2,50	37,9	2	2	80	28	3	1	0	3	0	5	5	
04.10.2009	1,0	2,50	38,3	2	2	84	32	3	1	0	3	0	5	5	
05.10.2009	1,0	2,50	38,9	2	2	92	32	3	1	0	3	0	5	5	740
06.10.2009	1,0	2,50	38,1	2	2	84	32	3	1	0	3	0	5	5	
07.10.2009	1,0	2,50	38,9	2	1	80	32	3	1	0	3	0	5	5	
08.10.2009	1,0	2,50	38,3	2	2	76	60	3	1	0	3	0	5	5	755
09.10.2009	1,0		38,3	2	2				1						
10.10.2009	1,0		37,9		2				1						
11.10.2009	1,0		38,3		1				1						
12.10.2009	1,0	2,50	38,0	2	2	80	32	3	1	0	3	0	5	5	774

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Epi-skleral-gefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
13.10.2009	1,0		37,9		2				1						
14.10.2009	1,0		37,6		2				1						
15.10.2009	1,0	2,50	37,7	2	2	80	36	3	1	0	3	0	5	5	796
16.10.2009	1,0		37,8		1				1						
17.10.2009	1,0		38,0		1				1						
18.10.2009	1,0		38,5		1				1						
19.10.2009	1,0	2,50	38,0	2	2	84	28	3	1	0	3	0	5	5	813
20.10.2009	1,0		38,6		1				1						
21.10.2009	1,0		38,5		1				1						
22.10.2009	1,0	2,50	37,9	2	1	76	28	3	1	0	3	0	5	5	828
23.10.2009	1,0		37,9		1				1						
24.10.2009	1,0		38,0		1				1						
25.10.2009	1,0		38,7		2				1						
26.10.2009	1,0	2,50	38,2	2	2	72	28	3	1	0	3	0	5	5	841
27.10.2009	1,0		38,2		2				1						
28.10.2009	1,0		37,8		1				1						
29.10.2009	1,0	2,50	37,6	2	2	68	28	3	1	0	3	0	5	5	852
30.10.2009	1,0		37,8		1				1						
31.10.2009	1,0		37,8		1				1						
01.11.2009	1,0		37,8		1				1						
02.11.2009	1,0	2,50	38,3	2	1	80	28	3	1	0	3	0	5	5	870
03.11.2009	1,0		38,3		1				1						
04.11.2009	1,0		38,3		2				1						
05.11.2009	1,0	2,50	38,4	2	1	88	28	3	1	0	3	0	5	5	886
06.11.2009	1,0		38,4		1				1						
07.11.2009	1,0		37,9		1				1						
08.11.2009	1,0		38,1		1				1						
09.11.2009	1,0	2,50	38,1	2	1	72	24	3	1	0	3	0	5	5	902
15.12.2009	1,0	3,00	38,8	2	1	76	28	3	1	0	3	0	5	5	1061
29.12.2009	1,0	3,25	38,2	2	1	100	32	3	1	0	3	0	5	5	1066
13.01.2010	1,0	4,25	38,4	2	2	92	36	3	1	0	3	0	5	5	
03.02.2010	1,0	3,25	38,7	2	2	84	24	3	2	0	3	0	5	5	
17.02.2010	1,0	3,25	38	2	1	80	24	3	3	0	3	0	5	5	
04.03.2010	1,0	3,25	38,3	2	1	88	32	3	3	0	3	0	5	5	
18.03.2010	1,0	3,00	39,1	2	1	84	28	3	4	0	3	0	5	5	1093
30.03.2010	1,0	3,00	39,2	2	1	88	28	3	1	0	3	0	5	5	

Tabelle IX-11: VT20, Ergebnisse der Serologie und PCR: Blots (Anzahl der Banden), IFAT-Titer (Verdünnungsstufe), PCR (N/A = negatives Ergebnis).

Datum	Lfd. Nr.	Bradyzoiten-Blot	Tachyzoiten-Blot	IFAT-Titer	Haut PCR Ct-Werte
20.08.2009	528	1	1	800	30,27
21.08.2009	530	1	5	800	30,84
22.08.2009	531	1	6	1600	29,5
23.08.2009	532				31,36
24.08.2009	544	4	6	1600	29,48
25.08.2009	546				
27.08.2009	557	7	7	1600	32,85
30.08.2009	566				33,71
02.09.2009	581	7	8	1600	28,02
04.09.2009	595				30,84
17.09.2009	645				24,37
21.09.2009	664	7	6	1600	
01.10.2009	720	9	8	1600	
05.10.2009	740				19,65
15.10.2009	796	10	9	3200	
19.10.2009	813				15,46
26.10.2009	841	10	9	3200	
02.11.2009	870	7	7		14,72
09.11.2009	902	9	10	6400	18,84
15.12.2009	1061	9	9	6400	
29.12.2009	1066				14,57
18.03.2009	1093	9	10	3200	N/A

Tabelle IX-12: VT20, Histologische Befunde: Ödem/Tachyzoiten-Nachweis/Zysten-Nachweis (+ = positiver Nachweis; - = nicht nachgewiesen), Zellinfiltrationen (+ = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig).

E-Nummer	Lfd. Nr.	Entnahme-Datum	Tag	dermales Ödem	Tachyzoiten-Nachweis	Zysten-Nachweis	Zellinfiltrationen	peri-zystische Zellinfiltrationen
E1920/09	528	20.08.2009	1	+	+	-	+++	-
E1934/09	530	21.08.2009	2	+	+	-	++ - +++	-
E1934/09	531	22.08.2009	3	+	+	-	+++	-
E1934/09	532	23.08.2009	4	+	+	+	+++	-
E1969/09	544	24.08.2009	5	+	+	+	+++	-
E1968/09	546	25.08.2009	6	+	+	+	+++	-
E1982/09	547	26.08.2009	7	+	-	+	+++	-
E2003/09	557	27.08.2009	8	-	-	+	++	-
E2020/09	561	28.08.2009	9	-	-	+	+	-
E2021/09	562	29.08.2009	10	-	-	+	+	-
E2022/09	566	30.08.2009	11	-	-	+	+	-
E2023/09	575	31.08.2009	12	-	-	+	+ - ++	-
E2033/09	580	01.09.2009	13	-	-	+	+	-
E2046/09	581	02.09.2009	14	-	-	+	+	-
E2076/09	589	03.09.2009	15	-	-	+	+	-
E2077/09	595	04.09.2009	16	-	-	+	+	-
E2078/09	596	05.09.2009	17	-	-	+	+	-
E2079/09	597	06.09.2009	18	-	-	+	+	-
E2103/09	610	07.09.2009	19	-	-	+	+	-
E2124/09	611	08.09.2009	20	-	-	+	+	-
E2125/09	621	10.09.2009	22	-	-	+	+	-
E2156/09	631	14.09.2009	26	-	-	+	+	-
E2233/09	645	17.09.2009	29	-	-	+	+	-
E2251/09	664	21.09.2009	33	-	-	+	+	-
E2303/09	671	24.09.2009	36	-	-	+	+	+
E2329/09	703	28.09.2009	40	-	-	+	+	-
E2394/09	740	05.10.2009	47	-	-	+	+	+
E2464/09	774	12.10.2009	54	-	-	+	+	-
E2552/09	813	19.10.2009	61	-	-	+	+	+ - +++
E2626/09	841	26.10.2009	68	-	-	+	+	+ - +++
E2703/09	870	02.11.2009	75	-	-	+	+	+ - +++
E2787/09	902	09.11.2009	82	-	-	+	+	+ - +++
E16/10	1066	29.12.2009	132	-	-	+	+	+ - +++
E671/10	1093	18.03.2010	211	-	-	+	+ - +++	+ - +++

Tabelle IX-13: VT22, Befunde der klinischen Untersuchungen: Verhalten (1 = aufmerksam; 2 = niedergeschlagen), BCS (nach Edmonson *et al.* 1989), Schleimhäute (1 = blass; 2 = blassrosa; 3 = rosa), Episkleralgefäße (1 = fein gezeichnet; 2 = mäßig gezeichnet; 3 = gut gezeichnet), Pansenfüllung (1 = schlecht gefüllt; 2 = mäßig gefüllt; 3 = gut gefüllt), Gangbild (nach Sprecher *et al.* 1997), Lymphknoten (0 = keine Veränderung), Haut (0 = keine Veränderungen; 1 = geringgradige Veränderungen/Verdickung), Ödeme (0 = keine Veränderungen), Zysten (0 = keine Zysten; 1 = 1-5 Stück; 2 = 6-10 Stück; 3 = 11-20 Stück; 4 = 21-30 Stück; 5 = >30 Stück).

Datum	Verhalten	BCS	Temp. °C	Schleimhäute	Episkleralgefäße	Herzfrequenz pro Min.	Atemfrequenz pro Min.	Pansenfüllung	Gangbild Grad 1-5	Lymphknoten	Haut	Ödeme in der Unterhaut	Zysten Vulva	Zysten Sklera	Lfd. Nr. Probe
07.10.2009	2,0	3,00	38,7	2	3	100	44	3	3	0	0	0	0	0	745
08.10.2009	1,0	3,00	38,8	2	3	108	48	3	3	0	0	0	0	0	762
12.10.2009	1,0	3,00	39,2	2	2	120	40	3	1	0	0	0	0	0	780
19.10.2009	1,0	3,00	39,1	2	1	126	30	3	1	0	0	0		3	814
26.10.2009	1,0	3,25	38,7	2	2	112	48	3	1	0	0	0	0	4	843
05.11.2009	1,0	2,75	39,1	2	1	120	44	3	1	0	1	0	0	5	888
15.12.2009	1,0			2	1				1	0	1			5	1058
29.12.2009	1,0	2,75		2	1	92	28		2	0	3	0	2	5	1069
13.01.2010	1,0	3,00	38,8	2	2	92	40	3	2	0	3	0	0	5	
03.02.2010	1,0	2,75	38,9	2	1	88	32	3	2	0	3	0	4	5	
17.02.2010	1,0	2,50	39,2	2	1	100	36	3	4	0	3	0	2	5	
30.03.2010	1,0	2,25	39,3	2	1	80	24	3	1	0	3	0	4	5	

Tabelle IX-14: VT22, Ergebnisse der Serologie und PCR: Blots (Anzahl der Banden), IFAT-Titer (Verdünnungsstufe), PCR (N/A=negatives Ergebnis).

Datum	Lfd. Nr.	Bradyzoiten-Blot	Tachyzoiten-Blot	IFAT-Titer	Haut PCR Ct-Werte
07.10.2009	745		4	400	31,54
08.10.2009	762		4	400	
12.10.2009	780		5	400	33,03
19.10.2009	814	5	6	1600	31,6
26.10.2009	843	8	10	1600	25,01
05.11.2009	888	8	10	6400	23,04
15.12.2009	1058	9	10	6400	
29.12.2009	1069				14,71

Tabelle IX-15: VT22, Histologische Befunde: Ödem/Tachyzoiten-Nachweis/Zysten-Nachweis (+ = positiver Nachweis; - = nicht nachgewiesen), Zellinfiltrationen (+ = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig).

E-Nummer	Lfd. Nr.	Entnahme-Datum	Tag	dermales Ödem	Tachyzoiten-Nachweis	Zysten-Nachweis	Zellinfiltrationen	perizystische Zellinfiltrationen
E2435/09	745	07.10.2009	1	+	+	-	+++	-
E2465/09	780	12.10.2009	6	-	-	+	-	-
E2551/09	814	19.10.2009	13	-	-	+	-	-
E2627/09	843	26.10.2009	20	-	-	+	-	-
E2747/09	888	05.11.2009	30	-	-	+	+	-
E17/10	1069	29.12.2009	84	-	-	+	+	+ - +++

Tabelle IX-16: Befunde der GKO-Mäuse: Tachyzoiten-Nachweis (+ = einzelne; ++ = mehrere; +++ = zahlreiche), Lebernekrosen/Peritonitis/Pneumonie (+ = nachweisbar; - = nicht nachweisbar).

E-/EL-Nummer	untersuchte Organe	Tachyzoiten-Nachweis	Lebernekrosen	Peritonitis	Pneumonie
E2607/08 EL5244	Haut, Skelettmuskulatur, Knochen, Ösophagus, Lunge, Peritoneum, Magen, Mesenterial-Lymphknoten, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E1400/10	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	-	+
E1401/10	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	-	+
E1402/10	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E1403/10	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E1712/10 EL5245	Haut, Skelettmuskulatur, Knochen, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas	+++	+	+	+
E1713/10	Gehirn, Skelettmuskulatur, Ösophagus, Herz, Lunge, Leber, Niere	+++	+	+	+
E517/11 EL5315	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E518/11 EL5316	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E1093/11	Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Hoden, Nebenhoden	+++	+	+	+
E1094/11	Skelettmuskulatur, Knochenmark, Herz, Lunge, Darm, Mesenterium, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E1095/11	Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas	+++	+	+	-
E1096/11	Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	-
E1811/11 EL5384	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E1812/11	Haut, Skelettmuskulatur, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	-	+
E1813/11	Haut, Skelettmuskulatur, Knochenmark	+	-	-	-
E1814/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Darm, Leber, Niere, Milz	+	-	-	-
E2061/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz	+++	+	+	+
E2062/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas	+++	+	-	+
E2579/11	Haut, Gehirn, Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Uterus, Ovar, Gekröse	+++	+	+	+

E-/EL- Nummer	untersuchte Organe	Tachy- zoiten- Nach- weis	Leber- nekro- sen	Perito- nitis	Pneu- monie
E2580/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Auge, Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Uterus, Ovar, Gekröse	+++	+	+	+
E2581/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Uterus, Ovar, Gekröse	+++	+	+	+
E2582/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Auge, Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Gekröse	+++	+	+	+
E2583/11	Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Nebenniere, Gekröse	+	-	+	+
E2584/11	Skelettmuskulatur, Gehirn, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Gekröse	+++	-	+	+
E2585/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Nebenniere, Uterus, Ovar, Gekröse	+++	-	+	+
E2586/11	Haut, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Darm, Leber, Niere, Milz, Uterus, Ovar, Gekröse	+++	+	+	+

2 Untersuchungsprotokolle

2.1 Status-Untersuchungs-Protokoll

Statusuntersuchung

Außentemperatur:

Versuchstiernummer:		Datum:	
Ohrmarkennummer:		Uhrzeit:	
Standort:		Untersucher:	
Körperhaltung:	Verhalten:	BCS:	Temp.:
Schleimhäute: Maul Nase Vulva (Präputium)	Flotzmaul:	ZNS: unauff./nicht näher unters./s.U. ESG: Bulbi: Hautturgor:	
Herz: Frequenz/min: Rhythmus Intensität Abgesetztheit Geräusche	Atmung: Frequenz/min Typ: Auskultation	Pansen: /2min Intensität: Füllung: Schichtung:	
Abdomen: Form PA/SA Bauchdecke Darmmotorik	Kot: Menge Farbe Konsistenz Zerkl. Beimengungen Geruch	Bewegungsapparat: Gelenke Klauen sonstiges	Gangbild:
Lymphknoten: Lnn. mandib. Lnn. parot. Lnn. retroph. Lnn. cerv. superf. Lnn. subiliaci	Rektal: Lnn. iliaci Unterdruck Bauchfell Pansen Niere	Geschlechtsapp.: sonstiges	
Harn: Farbe pH Transpar. Eiw. Gluk. Hb/Erys K.K. sonstiges	Haut/Unterhaut (Ödeme und Hautveränderungen beschreiben) Kopf Hals Vordergliedm. Hintergliedm. Rumpf Euter sonstiges		
Zysten:	keine	1-5 Stück	6-10 Stück
Sklerale Konj. links:			
Sklerale Konj. rechts:			
Vulva (Präputium):			
Sonstige Befunde:	Proben: Serum Anzahl: EDTA Anzahl: Hautbiopsie (Lokalisation beschreiben, Foto) Anzahl Paraformaldehyd 4 %: Anzahl nativ: Fotos:		
	Laufende Nr.:		

3 Fixationsmedien

3.1 Paraformaldehyd

10,7 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 8.20670) mit

4,15 ml 1 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1040) in

500 ml Aqua dest. lösen und auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

500 ml Aqua dest auf 80°C erhitzt zugeben und

40 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Nr. 1.04005) und

0,735 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.02382) darin lösen.

Auf einem Magnetrührer auf 70°C erhitzen und 1 N NaOH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 35256) zugeben bis die Lösung klar wird. Danach abkühlen lassen, auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen und bei 4°C lagern.

3.2 6,25%ige Glutardialdehydlösung

5 ml einer 25%igen Glutardialdehydlösung (Serva, Heidelberg, Nr. 23115) werden mit Sörensen-Phosphat-Puffer (siehe Abschnitt 7.1.1, S.204) auf 20 ml aufgefüllt.

4 Lösungen für die Herstellung der Kunststoffschnitte

4.1 Spüllösung

16,5 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 8.20670) mit

6,23 ml 1 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1040) in

1500 ml Aqua dest. lösen und auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen. Danach

105 g Saccharose (VWR INTERNATIONAL GMBH, DARMSTADT, Nr. 27483.294) und

1,105 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.02382) darin lösen und auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

4.2 Einbettungsmedium

60 ml Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (Merck, Darmstadt, Nr. 8.00588) mit
20 ml Methacrylsäuremethylester (Merck, Darmstadt, Nr. 8.05900),
16 ml Ethylenglykolmonobutylether (Merck, Darmstadt, Nr. 8.01554) und
2 ml Polyethylenglykol 400 (Merck, Darmstadt, Nr. 8.17003) mischen und
338 mg Benzoylperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 517909-500G) darin lösen.

5 Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte

5.1 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

7000 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit
2500 ml Aqua dest. und
100 ml 25%ige Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mischen.

5.2 70%iges Ethanol

7000 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit
2600 ml Aqua dest. mischen.

5.3 Hämalaun-Eosin-Färbung

5.3.1 0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung

100 ml 1%ige-HCl-Ethanol-Lösung mit
100 ml 70%igem Ethanol mischen.

5.3.2 Eosin-Lösung

10 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in
1000 ml erhitztem Aqua dest. lösen. Danach

1,5 ml 100%igen Eisessig (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) hinzugeben und filtrieren.

5.4 Färbung nach Giemsa

5.4.1 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung

97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 1,361 g in 100 ml Aqua dest. (Applichem, Darmstadt, Nr. A3620)

2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 1,419 g in 100 ml Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960)

Mischen und Erwärmen (80°C)

7 ml Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204) hinzugeben.

Auf einen pH-Wert von 5,0 einstellen und filtrieren.

5.4.2 0,5%ige Essigsäure

5 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in

995 ml Aqua dest. lösen.

5.5 PAS-Reaktion

5.5.1 Perjodsäure (1%)

10 g Perjodsäure (Sigma, St. Louis, USA, Nr.: P 7875) in 1000 ml Aqua dest. lösen

1,6 g Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Darmstadt, Nr.: 6268) in 100 ml Aqua dest. lösen

Die Lösungen werden getrennt angesetzt, gemischt und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

5.5.2 0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung

100 ml 1%ige-HCl-Ethanol-Lösung mit

100 ml 70%igem Ethanol mischen.

5.6 Masson-Goldner-Färbung

5.6.1 Weigerts Eisenhämatoxylin

5.6.1.1 Lösung A

10 g Hämatoxylin kristallin (Merck, Darmstadt, Nr. 1.04302) in
1000 ml 96%igem Ethanol lösen.

5.6.1.2 Lösung B

11,6 g Eisenchlorid (Merck, Darmstadt, Nr. 103943) mit
10 ml 25%ige Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) in
980 ml Aqua dest. lösen.

Lösung A und B vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 mischen.

5.6.2 0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung

100 ml 1%ige HCl-Ethanol-Lösung mit
100 ml 70%igem Ethanol mischen.

5.6.3 Rote Farbe-Gebrauchslösung

20 ml Lösung A mit
80 ml Lösung B und
20 ml Azophloxin-Lösung mischen und filtrieren.

5.6.3.1 Lösung A

5 g Säurefuchsin (Sigma, St. Louis, USA, Nr. A2284) mit
5 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in
500 ml Aqua dest. lösen.

5.6.3.2 Lösung B

10 g Ponceau de Xylidine (Waldeck GmbH, Münster, Nr. 1B-207) mit
10 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in

1000 ml Aqua dest. lösen.

5.6.3.3 Azophloxin-Lösung

1,25 g Azophloxin (Chroma, Waldeck GmbH, Münster, Nr. 40) mit
0,5 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in
250 ml Aqua dest. lösen.

5.6.4 0,5%ige Essigsäure

1000 ml Aqua dest. mit
5 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) mischen.

5.6.5 Phosphorwolframphosphorsäure-Orange G

15 g Wolframphosphorsäurehydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.00583) und
10 g Orange G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15925) in
500 ml Aqua dest. lösen.

5.6.6 Anilinblau

10 g Anilinblau (Serva, Heidelberg, Nr. 13645 mit)
10 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in
1000 ml Aqua dest. lösen.

6 Lösungen für die Färbung der Kunststoffschritte

6.1 Hämaun-Eosin-Phloxin-Färbung

6.1.1 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

10 ml 25%ige Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mit
700 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) und
250 ml Aqua dest. mischen.

6.1.2 Stammlösung Eosin (SE)

1,0 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in

1000 ml Aqua dest. lösen.

6.1.3 Stammlösung Phloxin (SP)

1,0 g Phloxin (Merck, Darmstadt, Nr. 15926) in

1000 ml Aqua dest. lösen.

6.1.4 Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung

468 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit

30 ml SE und

3 ml SP sowie

2,4 ml 96%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0458) mischen und anschließend filtrieren.

6.2 Färbung nach Giemsa

6.2.1 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung

97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 1,361 g in 100 ml Aqua dest. (Applichem, Darmstadt, Nr. A3620)

2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 1,419 g in 100 ml Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960)

Mischen und Erwärmen (80°C)

7 ml Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204) hinzugeben.

Auf einen pH-Wert von 5,0 einstellen und filtrieren.

6.2.2 0,5%ige Essigsäure

5 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in

995 ml Aqua dest. lösen.

6.3 PAS-Reaktion

6.3.1 Perjodsäure (1%)

10 g Perjodsäure (Sigma, St. Louis, USA, Nr.: P 7875) in 1000 ml Aqua dest. lösen

1,6 g Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Darmstadt, Nr.: 6268) in 100 ml Aqua dest. lösen

Die Lösungen werden getrennt angesetzt, gemischt und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

6.3.2 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

10 ml 25%ige Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mit

700 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) und

250 ml Aqua dest. mischen.

7 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

7.1 Probenvorbereitung

7.1.1 Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,4

Für die Gebrauchslösung 192 ml Lösung A und 808 ml Lösung B mischen.

7.1.1.1 Lösung A

9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat (neoLab, Heidelberg, Nr. 2830) in

1000 ml Aqua dest. lösen.

7.1.1.2 Lösung B

11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4820) in

1000 ml Aqua dest. lösen.

7.1.2 Waschlösung

6,84 g D(+)-Saccharose (neoLab, Heidelberg, Nr. 5015) in
100 ml Sörensen-Phosphatpuffer lösen.

7.1.3 Gebrauchsfertiges Fixativ

0,45 g D(+)-Saccharose (neoLab, Heidelberg, Nr. 5015) in
1 ml Aqua dest. mit
2 ml 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09060)
2 ml Veronalacetat-Puffer und
5 ml 2%ige Osmiumtetroxidlösung lösen.

7.1.3.1 2%ige Osmiumtetroxidlösung

1 g Osmiumtetroxid (chempur, Karlsruhe, Nr. 006051) in
50 ml Aqua bidest. lösen

7.1.3.2 Veronalacetat-Puffer pH 10,3

0,147 g Diethylbarbitursäure-Natriumsalz (Merck, Darmstadt, Nr. 6318) und
0,097 g Natriumacetat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4730) in
5 ml Aqua bidest. lösen

7.1.4 Glycidether-Mischung

Für die gebrauchsfertige Mischung 41,2 g Gemisch A mit 75 g Gemisch B und 1,5 ml DMP 30 (Serva, Heidelberg, Nr. 3697501) vermischen.

7.1.4.1 Gemisch A

38,32 g Glycid Ether 100 (Serva, Heidelberg, Nr. 2104502)
45,30 g 2-Dodecenylbernsteinsäureanhydrid (Serva, Heidelberg, Nr. 2075501)

7.1.4.2 Gemisch B

61,80 g Glycid Ether 100 (Serva, Heidelberg, Nr. 2104502)

56,34 g Methylnadicanhydrid (Serva, Heidelberg, Nr. 2945201)

7.2 Färbung der Semidünnschnitte

7.2.1 Toluidinblau

0,8 g Toluidinblau O (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nr. 0300.2) und

1 g Dinatriumtetraborat (Merck, Darmstadt, Nr. 6306) in

100 ml Aqua dest. lösen.

7.2.2 Safranin

1 g Safranin O (Chroma, Waldeck GmbH, Münster, Nr. 1B463),

1 g Dinatriumtetraborat (Merck, Darmstadt, Nr. 6306) und

40 g D(+)-Saccharose (neoLab, Heidelberg, Nr. 5015) mit

2-3 Tropfen Formalin in

100 ml Aqua dest. lösen

7.3 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

7.3.1 2%iges Uranylacetat

1 g Uranylacetat (Agar Scientific, Stansted, England, Nr. R1260A) in

50 ml aqua bidest. lösen

7.3.2 Bleicitrat

Für die Gebrauchslösung 6 ml Lösung B unter Rühren zu 32 ml Aqua bidest. geben, 4 ml Lösung A tropfenweise zugeben, 8 ml Lösung C hinzugeben und filtrieren (Hartfilter, H602).

7.3.2.1 Lösung A

1,655 g Bleinitrat (Merck, Darmstadt, Nr. 7398) in

5 ml Aqua bidest. lösen

7.3.2.2 Lösung B

2,94 g Natriumcitrat (Merck, Darmstadt, Nr. 6448) in

10 ml Aqua bidest. lösen

7.3.2.3 Lösung C

1 g NaOH-Plättchen (neoLab, Heidelberg, Nr. 1087) in

25 ml Aqua bidest. lösen

8 Lösungen für die Immunhistochemie**8.1 Wasserstoffperoxid-Lösungen****8.1.1 1%ige H₂O₂-Lösung**

6 ml 30%ige H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in

174 ml Aqua dest. lösen.

8.1.2 1%ige H₂O₂-Methanol-Lösung

6 ml 30%ige H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in

174 ml Methanol (neoLab, Heidelberg, Nr. 1600) lösen.

8.1.3 2%ige H₂O₂-Lösung

12 ml 30%ige H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in

168 ml Aqua dest. lösen.

8.1.4 5%ige H₂O₂-Lösung

36 ml 30%ige H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in

150 ml Aqua dest. lösen.

8.2 0,05 M Tris-Buffer-Saline (TBS) pH 7,6

60,5 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5670)

700 ml Aqua dest.

90 g NaCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1230)

2 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 5150)

Tris-Hydroxymethylaminomethan in Aqua dest. lösen und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,6 einstellen. Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH-Wert überprüfen. NaCl lösen und pH-Wert überprüfen.

Für die Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und auf einen pH-Wert von 7,6 einstellen.

8.3 DAB-Gebrauchslösung

10 mg 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-dihydrat-Tablette (Biotrend, Köln, Nr. 4170)

10 ml Aqua dest.

Tablette im Dunkeln in Aqua dest. lösen, filtrieren.

Vor Gebrauch mit 1 µl 30%igem H₂O₂ (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) pro 1 ml DAB-Lösung versetzen.

8.4 Natriumäthylat-Lösung

4g NaOH-Plätzchen (neoLab, Heidelberg, Nr. 1087)

200 ml Ethanol, reinst (neoLab, Heidelberg, Nr. 3050)

Plätzchen in Ethanol lösen. Lösung 2-3 Tage vor Gebrauch ansetzen. Flasche gut schließen, die Lösung verursacht schwere Verätzungen von Haut und Augen.

8.5 Zitronensäure-Phosphat-Puffer (ZPP) pH 6,0 (nach Lojda, ,Enzymhistochemische Methoden', 1976)

Für die Gebrauchslösung 179 ml Lösung A und 321 ml Lösung B mischen.

8.5.1 Lösung A

21,01 g Citrat-Monohydrat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4345) in

1000 ml Aqua dest. lösen

8.5.2 Lösung B

35,60 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.06580) in

1000 ml Aqua dest. lösen

8.6 0,01 M Citratpuffer pH 6,0

4,2 g Citrat-Monohydrat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4345)

2000 ml Aqua dest.

2 N NaOH (neoLab, Heidelberg, Nr. 5630)

Citrat-Monohydrat in Aqua dest. lösen und mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 einstellen.

8.7 Tris/EDTA-Puffer pH 9,0

2,42 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5670)

2000 ml Aqua dest.

4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. E-5134)

1 M HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 2806)

Tris-Hydroxymethylaminomethan und EDTA in Aqua dest. lösen und mit HCl auf einen pH-Wert von 9,0 einstellen.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung II-1: Schema eines Tachyzoiten von <i>B. besnoiti</i>	9
Abbildung II-2: Schema eines Bradyzoiten von <i>B. besnoiti</i>	11
Abbildung II-3: Schema einer Gewebezyste von <i>B. besnoiti</i>	12
Abbildung II-4: Schematische Darstellung des Zyklus von <i>B. besnoiti</i>	16
Abbildung IV-1: VT4, akutes Stadium: Übersicht der klinischen Symptome.....	74
Abbildung IV-2: VT4, akutes Stadium: Rektaltemperatur und Pansenfüllung	75
Abbildung IV-3: VT4, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich	77
Abbildung IV-4: VT4, akutes Stadium (Tag 8): Ausgeprägtes, diffuses, subepidermales Ödem	78
Abbildung IV-5: VT6, akutes Stadium: Übersicht der klinischen Symptome.....	81
Abbildung IV-6: VT6, akutes Stadium: Rektaltemperatur und Pansenfüllung	82
Abbildung IV-7: VT6, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich	84
Abbildung IV-8: VT6, (Tag 13): Sehr junge Zyste in der Dermis.....	86
Abbildung IV-9: VT20, Akutes Stadium: Übersicht der klinischen Symptome	90
Abbildung IV-10: VT20, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich	92
Abbildung IV-11: VT20, akutes Stadium (Tag 1): Drei intraendothelial, innerhalb einer parasitophoren Vakuole liegende Tachyzoiten.....	93
Abbildung IV-12: VT20, akutes Stadium (Tag 1): Zahlreiche positive Signale in der Dermis ..	94
Abbildung IV-13: VT20, akutes Stadium (Tag 1): Zahlreiche intraendothelial liegende Tachyzoiten	95
Abbildung IV-14: VT20, (Tag 4): Diffuses zytoplasmatisches Signal in einer hypertrophierten Wirtszelle mit zwei Zellkernen	96
Abbildung IV-15: VT20 (Tag 6): Junge Zyste	97
Abbildung IV-16: VT20, chronisches Stadium (Tag 12): Junge Zyste.....	98
Abbildung IV-17: VT20, chronisches Stadium (Tag 14): Pathologische Mitosefigur im Wirtszellzytoplasma einer jungen Zyste	99
Abbildung IV-18: VT20, chronisches Stadium (Tag 47): Reife Zyste.....	101

Abbildung IV-19: VT20, chronisches Stadium (Tag 61): Multiple grünliche korpuskuläre Elemente innerhalb einer parasitophoren Vakuole	102
Abbildung IV-20: VT20, Akutes Stadium (Tag 1): Tachyzoit von <i>B. besnoiti</i>	103
Abbildung IV-21: VT22, Ct-Werte (als Maß für die Menge der Parasiten-DNA) und reziproker IFAT-Titer im Vergleich	105
Abbildung IV-22: Übersicht der Zystenentwicklung	108
Abbildung IV-23: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Typische ausgereifte Zyste	110
Abbildung IV-24: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Zahlreiche <i>Besnoitia</i> -Zysten in der Klauenlederhaut	111
Abbildung IV-25: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Zahlreiche reife <i>Besnoitia</i> -Zysten in der Klauenlederhaut	112
Abbildung IV-26: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Klauenlederhaut: Hochgradige, diffuse, eosinophil-granulozytäre und lymphoplasmazelluläre Zellinfiltrate	113
Abbildung IV-27: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zahlreiche <i>B. besnoiti</i> -Zysten in der Faszie.	114
Abbildung IV-28: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zahlreiche <i>B. besnoiti</i> -Zysten in der skleralen Konjunktiva	114
Abbildung IV-29: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zyste im Irisstroma	115
Abbildung IV-30: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Invasion des Zystenlumens	116
Abbildung IV-31: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Mehrere reife Zysten in der Faszie	118
Abbildung IV-32: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Drei Zysten im Stroma der Iris.	118
Abbildung IV-33: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Zyste	119
Abbildung IV-34: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Ultrastruktur der Zystenwand	121
Abbildung IV-35: VT22, chronisches Stadium (Tag 189): Ultrastruktur der Zystenwand	122
Abbildung IV-36: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Bradyzoit von <i>B. besnoiti</i>	123
Abbildung IV-37: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Anteriores Drittel eines Bradyzoiten	124
Abbildung IV-38: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Bradyzoit mit intrazytoplasmatischen Ansammlungen von elektronendichtem, granulären Material	125
Abbildung IV-39: VT20, chronisches Stadium (Tag 293): Degenerierender Bradyzoit	126
Abbildung IV-40: GKO-Maus, akutes Stadium (Leber): Zahlreiche Tachyzoiten	127

Abbildung IV-41: GKO-Maus, akutes Stadium (Leber): Intravasale Tachyzoiten	128
Abbildung IV-42: GKO-Maus, Tachyzoit von <i>B. besnoiti</i>	130
Abbildung IV-43: GKO-Maus, Endodyogenie-Stadium im Wirtszellzytoplasma	131
Abbildung IV-44: GKO-Maus, drei Tachyzoiten von <i>B. besnoiti</i> im finalen Stadium der Endodyogenie	132
Abbildung IV-45: GKO-Maus, Phagozytose eines Tachyzoiten von <i>B. besnoiti</i>	133
Abbildung IV-46: VT20, Chronisches Stadium (Tag 68): T-Zell-reiches Infiltrat in der Umgebung einer Zyste	135
Abbildung IV-47: VT22, Chronisches Stadium (Tag 189): In den hochgradigen perizystischen Zellinfiltrationen finden sich nur wenige B-Zellen	135
Abbildung IV-48: VT20, Chronisches Stadium (Tag 293): Immunhistochemische Darstellung von Makrophagen	136
Abbildung IV-49: VT20, Chronisches Stadium (Tag 26): Unreife Zyste mit umgebender grünlicher Schicht	137
Abbildung IV-50: VT20, Chronisches Stadium (Tag 26): Unreife Zyste mit umgebender violetter Schicht	138
Abbildung IV-51: VT6, Chronisches Stadium (Tag 25): Unreife Zyste in der PAS-Reaktion ..	139
Abbildung IV-52: VT22, Chronisches Stadium (Tag 189): Reife Zyste	140
Abbildung V-1: GKO-Maus, akutes Stadium (Leber): Zahlreiche <i>B. besnoiti</i> -Tachyzoiten	157

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle II-1: Histologische Veränderungen im akuten Stadium der bovinen Besnoitiose	28
Tabelle II-2: Gewebe, in denen beim Rind <i>B. besnoiti</i> -Zysten gefunden werden können	30
Tabelle II-3: Abfolge der klinischen Symptome nach experimenteller Infektion mit <i>B. besnoiti</i>	40
Tabelle IV-1: Gewebe in denen bei der Sektion von VT20 und VT22 Zysten gefunden wurden	117
Tabelle IX-1: VT4, Befunde der klinischen Untersuchungen	177
Tabelle IX-2: VT4, Ergebnisse der Serologie und PCR	179
Tabelle IX-3: VT4, Histologische Befunde	180
Tabelle IX-4: VT6, Befunde der klinischen Untersuchungen	181
Tabelle IX-5: VT6, Ergebnisse der Serologie und PCR	183
Tabelle IX-6: VT6, Histologische Befunde	184
Tabelle IX-7: VT8, Befunde der klinischen Untersuchungen	185
Tabelle IX-8: VT8, Ergebnisse der Serologie und PCR	187
Tabelle IX-9: VT8, Histologische Befunde	188
Tabelle IX-10: VT20, Befunde der klinischen Untersuchungen	189
Tabelle IX-11: VT20, Ergebnisse der Serologie und PCR	191
Tabelle IX-12: VT20, Histologische Befunde	192
Tabelle IX-13: VT22, Befunde der klinischen Untersuchungen	193
Tabelle IX-14: VT22, Ergebnisse der Serologie und PCR	193
Tabelle IX-15: VT22, Histologische Befunde	193
Tabelle IX-16: Befunde der GKO-Mäuse	194

XII. DANKSAGUNG

Diese Arbeit ist zu gleichen Teilen im Institut für Tierpathologie und in der Klinik für Wiederkäuer entstanden.

Herrn Prof. Dr. Walter Hermanns danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für das Bereitstellen eines Arbeitsplatzes am Institut für Tierpathologie, viele anregende Gespräche und die intensive Förderung und Unterstützung während der Promotion.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Klee danke ich für die Überlassung des Themas, für das Bereitstellen eines Arbeitsplatzes an der Klinik für Wiederkäuer und konstruktive Gespräche während des klinischen Teils dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Nicole Gollnick für die intensive Betreuung während des klinischen Teils dieser Arbeit, fortwährende Unterstützung, stundenlange konstruktive Diskussionen und ganz besonders für den Anruf im Mai 2009.

Danken möchte ich Herrn Dr. Monir Majzoub-Altweck für seine Geduld, die Beantwortung vieler Fragen, ein offenes Ohr zu jeder Zeit und die tatkräftige Unterstützung beim Lösen zahlreicher Probleme.

Herrn Dr. Gereon Schares möchte ich danken für die freundliche Aufnahme und Betreuung im Institut für Epidemiologie (Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen), viele scharfsinnige Anmerkungen sowie die gute und fruchtbare Zusammenarbeit über die Jahre.

Herrn Dr. Walter Basso (Institut für Parasitologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich) danke ich für die freundliche Überlassung des Kaninchen-Antiserums für die Immunhistochemie.

Für die finanzielle Unterstützung des Übertragungsversuches möchte ich mich bei Prionics AG (Schlieren, Schweiz) bedanken.

Den Mitarbeitern und Assistenten des Instituts für Tierpathologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre. Insbesondere danken möchte ich Frau Elisabeth Kempster für ihre vielfältige Unterstützung in immunhistochemischen Dingen; Frau Angela Siebert, Frau Michaela Nützel, Frau Doris Merl und Frau Heike Sperling für ihre hervorragende technische Assistenz sowie Frau Beate Schmidt für den täglichen Beistand.

Herrn Dr. Andreas Blutke danke ich für viele gute Ideen und Anregungen sowie die moralische Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Epidemiologie (Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen) für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit. Vor allem danke ich Frau Lieselotte Minke, Frau Aline Maksimov und Frau Susann Schares für ihre exzellente Arbeit. Bei Herrn Daland Herrmann, Herrn Pavlo Maksimov und Frau Aline Maksimov möchte ich mich besonders für die ausgesprochen tolle Zeit in Wusterhausen bedanken.

Den Mitarbeitern und Assistenten der Klinik für Wiederkäuer danke ich für ihre Hilfe und den technischen Rat, hier seien insbesondere Frau Ingrid Hartmann, Frau Christina Beyer und Frau Monika Altmann erwähnt.

Ohne Herrn Martin Pichlmair wäre die Durchführung des Projektes unmöglich gewesen, vielen Dank! Herzlicher Dank geht an Maria Pichlmair insbesondere für die kulinarische Unterstützung. Vielen Dank Georg „Bürgsti“ Mührer, Fritz Baumann, Markus Liebl und Dr. Josef Selmair für die tatkräftige Unterstützung und guten Ratschläge.

Meiner Freundin Maite möchte ich danken für ihre Unterstützung und Geduld zu jeder Tages- und Nachtzeit sowie ihre hervorragende künstlerische Assistenz.

Last but not least: Julia, vielen herzlichen Dank! Es war eine großartige Zeit und eine Freude mit dir zusammenzuarbeiten.